

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Zellbiologie (Tumorforschung)
Arbeitsgruppe DNA-Reparaturlabor

Einfluss der Expression und Funktion von DNA Reparaturgenen auf die Therapieresistenz von Leukämiezellen

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Bernd Meurer
aus Düsseldorf
2009

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. M. Forsting
1. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. rer. nat. J. Thomale
2. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. U. Dühsen

Tag der mündlichen Prüfung: 19.05.2010

Inhalt

1.	Einleitung	6
1.1	Chemotherapie-Resistenzen in der Tumorthherapie	6
1.1.1	Transportsysteme	7
1.1.2	Detoxifizierung	8
1.2	Resistenzentwicklung und DNA-Reparatur	9
1.2.1	Einschritt-Reparatur	10
1.2.2	Mismatch-Reparatur	12
1.2.3	Basen-Exzisions-Reparatur	13
1.2.4	Nukleotid-Exzisions-Reparatur	14
1.2.5	Doppelstrangbruch-Reparatur	15
1.3	Chronisch lymphatische Leukämie und DNA-Reparatur	18
1.4	Das DNA-Reparatur-Netzwerk (Aufgabenstellung)	21
2.	Material und Methoden	22
2.1	Verwendete Materialien	22
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	22
2.1.2	Puffer und Lösungen	23
2.1.2.1	Puffer und Lösungen für Nitrosoharnstoffe	23
2.1.2.2	Lösungen und Medien für die Zellkultur	24
2.1.2.3	Puffer und Lösungen für biochemische Zwecke	25
2.1.3	Geräte	27
2.1.4	Software	28
2.2	Methoden	28
2.2.1	Zellkultur	28
2.2.1.1	Isolierung von Lymphozyten aus Vollblut	28
2.2.1.2	B-Zell-Isolierung	28
2.2.1.3	Kultivierung der Zellen („Liquid holding“)	29
2.2.1.4	Alkylierung von Zell-Suspensionen	30
2.2.1.5	Einzelzell-Gelelektrophorese zur Bestimmung von DNA-Strangbrüchen („Comet Assay“)	30
2.2.1.6	Bestimmung abasischen Stellen und DNA-Strangbrüchen	30
2.2.1.7	Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen (MAK-Test)	31
2.2.1.8	Immunofluoreszenz-Messung der Kern DNA	31
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	32

2.2.2.1 RNA Isolierung mit Qiagen RNeasy Kit	32
2.2.2.2 Isolierung von mRNA aus Vollblut	32
2.2.2.3 Handling von RNA	33
2.2.2.4 Gel-Elektrophorese	33
2.2.2.5 RNA-Quantifizierung	34
2.2.2.6 RNA- Amplifizierung	35
2.2.2.7 Hybridisierung des PAN-Arrays mit gelabelten RNA- Sonden	36
3. Ergebnisse	37
3.1 Charakterisierung von CLL-Patienten	37
3.1.1 Isolierung von CD19 ⁺ -Lymphozyten	37
3.2 Toxizität DNA-schädigender Substanzen bei normalen und bei CLL-Lymphozyten	38
3.2.1 Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen nach Zytostatika-Behandlung <i>ex vivo</i>	38
3.2.2 Apoptose-Induktion nach EtNU-Behandlung	42
3.2.3 Apoptose nach Melphalan-Exposition	43
3.2.4 Anzahl der apoptotischen Zellen nach Cisplatin-Exposition	45
3.2.5 Anzahl der apoptotischen Zellen ist abhängig vom Reparatur-Phänotyp	45
3.3 Nachweis der Bildung und des Wiederverschlusses von Reparatur- induzierten DNA-Strangbrüchen	46
3.3.1 Prozessierung Schadstoff-induzierter DNA-Strangbrüche bei normalen Lymphozyten nach EtNU-Exposition	47
3.3.2 Prozessierung Schadstoff-induzierter DNA-Strangbrüche bei CLL-Lymphozyten nach EtNU-Exposition	48
3.3.3 Die Prozessierung Schadstoff-induzierter DNA-Strangbrüche ist pharmakologisch modulierbar	51
3.3.4 Messung von Melphalan-induzierten DNA-Schäden im „Comet Assay“	54
3.3.5 Messung von Cisplatin-induzierten DNA-Schäden im „Comet Assay“	54
3.4 Microarray Analysen zur Untersuchung von Gen- expressionsmustern bei CD19 ⁺ -Lymphozyten	55
3.4.1 Vergleichbarkeit der Cy3- und Cy5-Markierung	58
3.4.2 Reproduzierbarkeit der Proben auf unterschiedlichen	

	Microarrays	58
3.4.3	RNA-Expressionsanalyse von CD19 ⁺ -Lymphozyten	60
3.4.4	Untersuchung des Genexpressionsmusters von CLL-Lymphozyten im Hinblick auf die DNA-Reparaturkapazität	60
3.4.5	Clusteranalyse der Genexpressionsmuster von CD19 ⁺ -Lymphozyten	62
3.4.6	Genexpressionsanalysen der individuellen DNA-Reparaturwege	65
4.	Diskussion	75
4.1	Eine Vielzahl von Einflussfaktoren erschwert die Bestimmung der DNA-Reparaturkapazität	77
4.2	Neben der DNA-Reparaturkapazität können auch andere Ursachen zur Chemotherapie-Resistenz von Leukämie-Zellen beitragen	78
4.3	Funktionelle Untersuchungen zeigen eine parallele Nutzung unterschiedlicher DNA-Reparaturwege zur Schadensprozessierung	80
4.4	Genexpressionsanalysen identifizieren mögliche Schlüsselenzyme der DNA-Reparatur die entscheidend zur Resistenzentwicklung gegenüber Chemotherapeutika beitragen	82
4.4.1	Bedeutung der Basen-Exzisions-Reparatur für die Resistenzentwicklung	85
4.4.2	Bedeutung der Nukleotid-Exzisions-Reparatur für die Resistenzentwicklung	87
4.4.3	Bedeutung der Doppelstrangbruch-Reparatur für die Resistenzentwicklung	88
4.4.4	Bedeutung des „non-homologous end-joining“ für die Resistenzentwicklung	88
4.4.5	Die Expression des ATM-Gens ist in resistenten CLL-Lymphozyten erhöht	90
5.	Zusammenfassung	94
6.	Literaturnachweis	95
7.	Anhang	116
7.	Lebenslauf	118

1. Einleitung

1.1 Chemotherapie-Resistenzen in der Tumorthherapie

Bei der Behandlung maligner Tumore gehört die zytotoxische oder zytostatische Chemotherapie zu den Standardverfahren. Dabei stellt die Resistenz gegenüber der Chemotherapie klinisch das größte Problem dar (Colvin & Chabner, 1990).

Primäre Therapieresistenz ist bereits vor dem Start der Behandlung in der Tumorstammzelle angelegt. Sekundäre Resistenzen treten im Laufe der Tumorentwicklung neu auf und beruhen auf einer Selektion von Tumorzellen, die gegenüber zytotoxisch wirkenden Substanzen weniger empfindlich sind. Diese sekundären Resistenzen entstehen über adaptive Mechanismen und werden durch die genetische Instabilität von Tumorzellen und durch den mutagenen Charakter vieler Zytostatika begünstigt (Griswold et al., 1981).

Das klinische Bild der Chemotherapie-Resistenz ist multifaktoriell bedingt und schließt häufig pharmakologische, systemische und zellkinetische Faktoren ein, wobei jedoch meist die zelluläre Resistenz für ein Therapieversagen verantwortlich ist. (Skovsgaard et al., 1994)

Diese veränderte Empfindlichkeit von Tumorzellen auf zellulärer Ebene gegen zytotoxisch wirksame Substanzen kann verschiedene Ursachen haben. Neben veränderter Transportfunktion und Veränderungen im zellulären Metabolismus kommt aufgrund der verwendeten DNA-reaktiven Chemotherapeutika eine Veränderung der DNA-Reparaturkapazität oder eine zelluläre Toleranz diesen Schäden gegenüber in Betracht (Brent et al., 1985; Curt et al., 1986; Harris & Hochhauser, 1992).

In den folgenden Abschnitten werden deshalb die verschiedenen zellulären Möglichkeiten zur Chemotherapie-Resistenzentwicklung vorgestellt (Abb. 1).

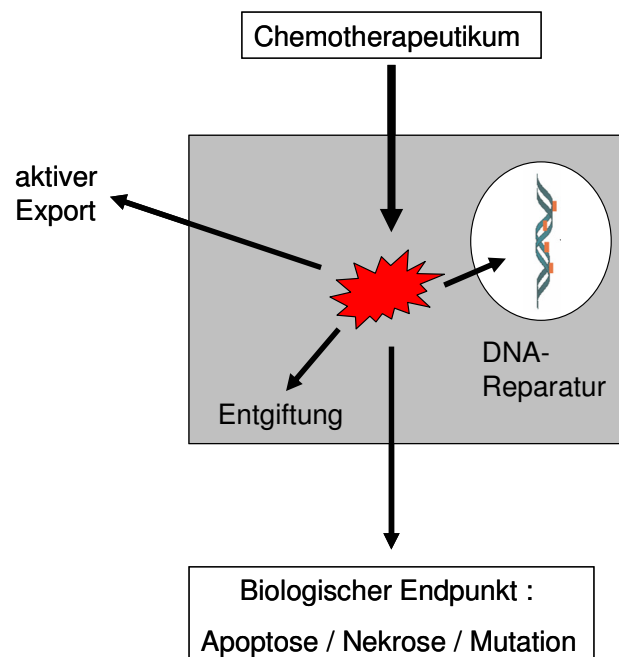


Abb. 01: Mechanismen zellulärer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika (nach Skovsgaard et al., 1994)

1.1.1 Transportsysteme

Durch verzögerten zellulären Import oder gesteigerten Export wird die Menge der zytotoxischen Substanz im Intrazellulärraum wesentlich verringert. So ist eine Reihe von strukturell und funktionell ähnlichen Transmembranproteinen wie z.B. der ABC („ATP binding cassette“)-Transmembrantransporter bekannt. Diese führen über ein ATP abhängiges Effluxsystem zu einer Verminderung der zytotoxischen Wirkung (Gottesman et al., 2002; Kruh & Belinsky, 2003). Resistente Zellen weisen dabei häufig eine erhöhte Genexpression dieser Proteine auf und sind oft gleichzeitig kreuzresistent gegenüber einigen strukturell und funktionell unterschiedlichen zytotoxischen Substanzen.

Insgesamt wird diese erhöhte Aktivität der Transportproteine, die eine zelluläre Resistenz bedingen, unter dem Begriff des MDR („multi drug resistance“)-Phänotyp zusammengefasst.

Durch die hohe Expression der Effluxpumpe MDR 1 sind z.B. hämatopoetische Stammzellen vor der zytotoxischen Wirkung von Doxorubicin, Anthracyclinen und Taxanen geschützt (Chaudhary & Roninson, 1991; Gottesman & Pastan, 1993; Maze et al., 1997). Ein Einfluss einer veränderten Aufnahme-Kapazität auf die Resistenzentwicklung konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Bank et al., 1989).

1.1.2 Detoxifizierung

Biotransformationsreaktionen, die durch so genannte „drug metabolizing enzymes“ (DMEs) katalysiert werden, können ebenso zur Resistenzentwicklung führen. Dabei wird im menschlichen Organismus zwischen Phase I- und Phase II-Reaktionen unterschieden.

Bei Phase I-Reaktionen kommt es zur Einführung oder Umwandlung funktioneller Gruppen. Die Ausgangsstoffe werden durch Oxidations- und Reduktions-Reaktionen, sowie Methylierungen und Desulfurierungen verändert und biologisch inaktiviert.

Wahrscheinlich als adaptive Antwort auf schädliche Umwelteinflüsse hat sich die bekannteste Gruppe etabliert: die Superfamilie der Cytochrom P 450 abhängigen Monooxygenasen (CYP 450) (Nebert & Gonzalez, 1987). In einigen Fällen (Pharmaka, Karzinogene) werden Fremdstoffe jedoch durch diese Umwandlung erst wirksam (Giftung). Die erhöhte Expression von CYP 450 bzw. einiger Unterfamilien konnte in einer ganzen Reihe humaner Krebserkrankungen nachgewiesen werden (Murray et al., 1997). Durch die Erstellung von CYP 450 Profilen konnte eine selektive Aktivierung von zytotoxisch wirksamen Substanzen (z.B. Cyclophosphamid, Ifosphamid, Dacarbazin und Procarbazin) in Tumorzellen mit gesteigerter Genexpression im Vergleich zu Normalgewebe nachgewiesen werden (Patterson & Murray, 2002). Die tumorspezifische Wirkung dieser Chemotherapeutika hängt so unter anderem vom Aktivitätsgrad dieses Enzyms ab, so dass eine Depletion der CYP-Aktivität demnach zu einer zellulären Resistenz führen kann (Abb. 2).

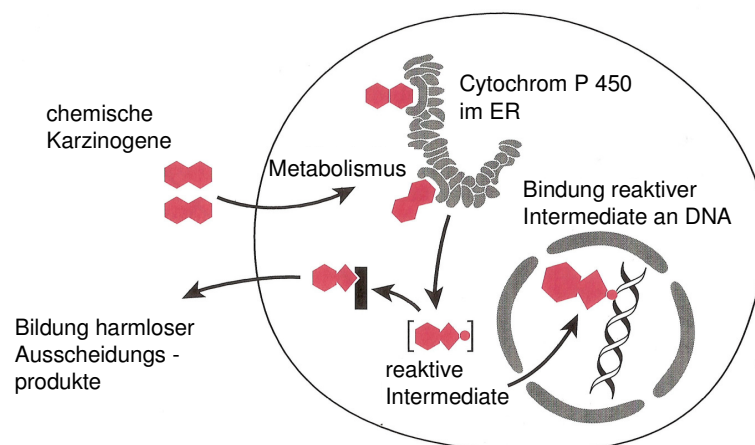


Abb. 02: **Metabolische Aktivierung von indirekt DNA-reaktiven Substanzen durch das Cytochrom P 450 System** (nach Nebert et al., 1982). Durch das Cytochrom P 450 System kann es zur Bildung reaktiver Intermediate kommen, die an nukleophile Zentren der DNA binden. ER = endoplasmatisches Retikulum.

Die Resistenz gegenüber Cyclophosphamid kann außerdem durch eine erhöhte Aktivität des Enzyms Aldehyddehydrogenase (aus der Klasse der Oxidoreduktasen) vermittelt werden (Kastan et al., 1990).

Bei Phase II-Reaktionen kommt es zur Konjugation mit sehr polaren, negativ geladenen Molekülen. Dadurch werden die Metabolite gut wasserlöslich und können mit Galle oder Harn ausgeschieden werden.

Bei der Entgiftung sowohl von endogenen als auch von exogenen toxischen und elektrophilen Substanzen spielt die Gruppe der Glutathion-S-Transferase (GST) zusammen mit SH-Gruppen tragenden Proteinen wie Metallothionein und Glutathion (GSH) eine wichtige Rolle (Chao, 1996). Erhöhte GST Aktivität kann so über einen veränderten Zytostatika-Metabolismus zur zellulären Resistenz führen (Morrow & Cowan, 1990). Alkylierende Substanzen wie z.B. Chlorambucil, Melphalan oder Cyclophosphamid-Metabolite wurden dabei als GST-Substrate identifiziert (Townsend & Tew, 2003). Allerdings wurden keine Aktivitätsunterschiede von GST, erniedrigte Spiegel von GSH oder Veränderungen der Metallothionein mRNA-Expression zwischen sensitiven und resistenten CLL-Lymphozyten gefunden (Bramson et al., 1995a & 1995b).

1.2 Resistenzentwicklung und DNA-Reparatur

Durch DNA-Reparaturmechanismen können Zellen schadhafte Veränderungen der DNA-Struktur beseitigen. Dadurch wird die Integrität der DNA, die ständig durch endogene Toxine (z.B. freie Radikale) aus dem zellulären Umfeld und exogene Noxen (z.B. Karzinogene, UV-Licht) bedroht wird, gewährleistet. Zur Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität und zur Weitergabe der unveränderten genetischen Information an die Tochterzelle, gibt es eine Vielzahl von DNA-Reparaturmechanismen (Christmann et al., 2003; Sancar et al., 2004). Dieses DNA-Reparatursystem besteht aus teilweise sehr selektiv auf bestimmte Schadenstypen reagierenden Systemen, andere Reaktionswege weisen hingegen eine sehr breite Substratspezifität auf. Vielfach beruht die Wirkung der z.Z. klinisch gebräuchlichen Chemotherapeutika auf einer Interaktion und / oder Schädigung genomischer DNA. Daher spielen DNA-Reparaturprozesse in der Resistenzentwicklung gegenüber einer Chemotherapie eine große Rolle (Barret & Hill, 1998; Chaney & Sancar, 1996; Drablos et al., 2004; Madhusudan & Middleton, 2005; Panasci et al., 2001).

Vor allem für die Gruppe der alkylierenden Agenzien wurde der Zusammenhang zwischen DNA-Reparaturkompetenz der Zielzellen und Zytotoxizität nachgewiesen (Baer et al., 1993; Dolan et al., 1989; Lijinsky et al., 1994). Es zeigt sich auch, dass bestimmte DNA-Schäden parallel durch verschiedene Mechanismen eliminiert werden können, so dass alternative Reparaturwege möglich sind (Bronstein et al., 1992) (Abb. 3).

1.2.1 Einschnitt Reparatur durch O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase

Durch die Einwirkung von alkylierenden Substanzen, wie Methyl- oder Ethyl-Nitrosoharnstoff (MeNU, EtNU) kommt es zur Bildung von unterschiedlichen N- und O-alkylierten Purinen und Pyrimidinen in der DNA. Obwohl das Addukt O⁶-Alkylguanin nur etwa 8 % der Alkylierungsschäden der DNA ausmacht, stellt es aufgrund seiner sowohl zytotoxischen als auch mutagenen Wirkung eine kritische Läsion für die Zelle dar (Beranek, 1990). Durch die veränderten Eigenschaften von O⁶-Methylguanin bzw. O⁶-Ethylguanin kommt es in replizierenden Zellen in der Basenpaarungsregion des Guanins zu einem Fehleinbau von Thymin anstelle von Cytosin in den neu synthetisierten Strang (Christmann et al., 2003). Dieser Schadenstyp wird mit einem Einschnitt-Reparaturmechanismus durch die O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) beseitigt, welche die Alkylgruppe aus der DNA auf das aktive Zentrum des Enzyms überträgt (Pegg et al., 1995; Zak et al., 1994). Durch die Übertragung der Alkylgruppe wird das Enzym irreversibel inaktiviert und proteasomal degradiert. Daher wird, falls nur eine begrenzte Menge des Enzyms vorhanden ist, ein anfangs schneller Transfer der Methyl- bzw. Ethyl-Gruppen durch den Verbrauch des Enzyms limitiert (Lindahl et al., 1982). Durch die unvollständige Reparatur dieser Addukte kommt es neben den oben genannten Mutationen außerdem zu einer Akkumulation von DNA-Strangbrüchen mit daraus resultierender Induktion der Apoptose. Während eine Überexpression von MGMT vor Nitrosoharnstoff-induzierten T-Zell-Lymphomen in hämatopoetischen Stammzellen schützt (Dumenco et al., 1993; Reese et al., 2001) und bei Mäusen zu einer niedrigeren Mutationsfrequenz in der Leber führt (Zhou et al., 2001), kommt es bei MGMT-defizienten Zellen zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber O⁶-Methylguanin, da sie diesen Schadenstyp nicht reparieren können (Day et al., 1980, Yarosh et al., 1983). Ebenso zeigen MGMT-defiziente „knock-out“ Mäusen eine erhöhte

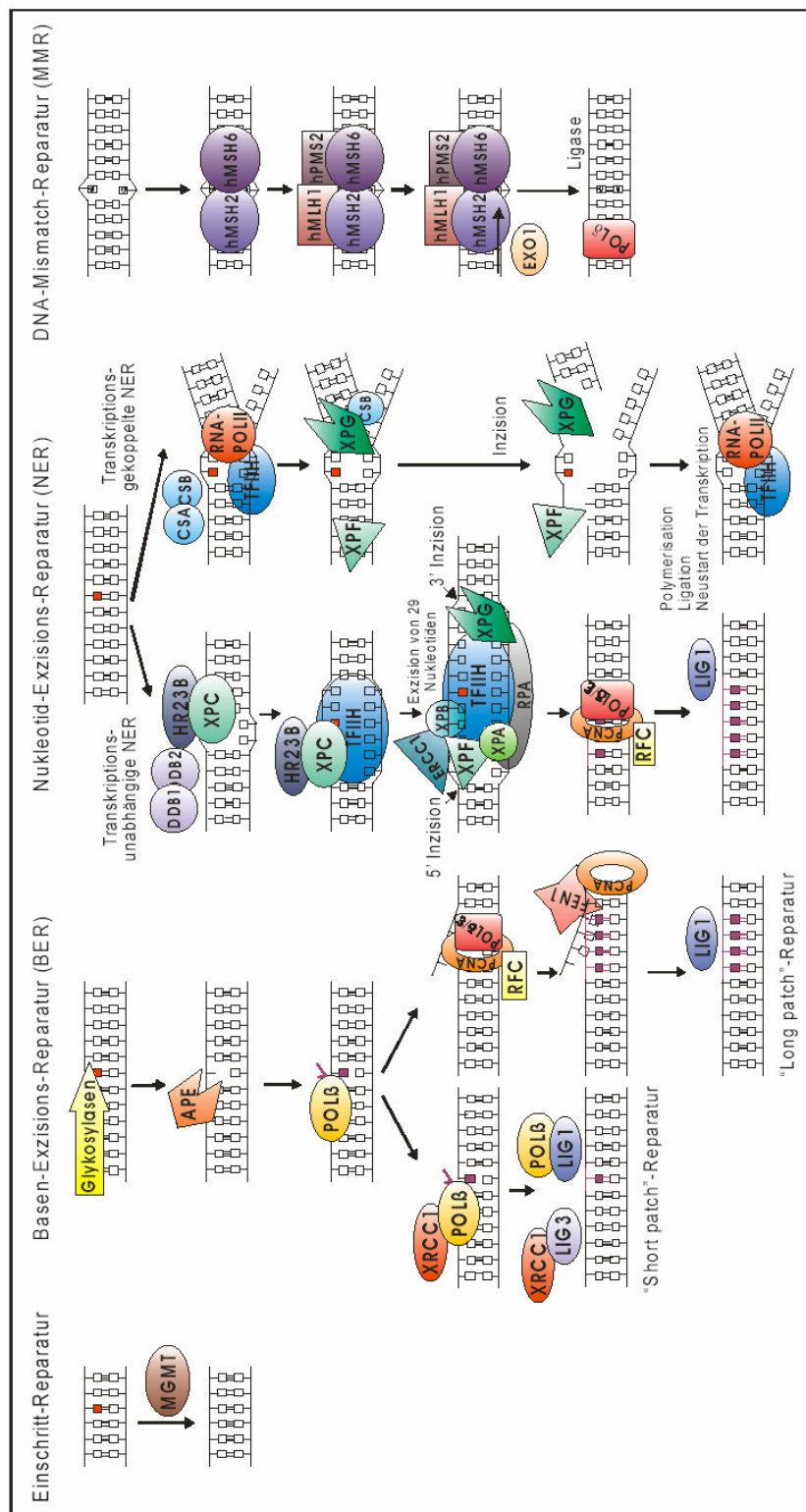


Abb. 03: Überblick über die verschiedenen Reparaturwege bei der Prozessierung von DNA-Schäden. Einschnitt-Reparatur (MGMT), Basen-Exzisions-Reparatur (BER), Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) und Mismatch-Reparatur (MMR). (Modifiziert von T. Bracker (IFZ) nach Christmann et al., 2003 und Sancar et al., 2004)

Sensitivität gegenüber O⁶-Methylguanin bzw. O⁶-Ethylguanin im Vergleich zu Wildtyptieren (Shiraishi et al., 2000). Eine Regulation der Expression von MGMT erfolgt durch die endogene Methylierung des Genpromoters bzw. des Gens. Die Methylierung des Promoters führt zu einer Inhibition der Genexpression und so zu einer Sensitivierung gegenüber alkylierenden Substanzen (Qian et al., 1995), während die Methylierung der Gensequenz selbst eine Überexpression hervorruft und mit einer Resistenz gegen chloroethylierende Substanzen korreliert ist (Christmann et al., 2001).

1.2.2 Mismatch-Reparatur

Die Hauptaufgabe des Mismatch-Reparatur (MMR)-Systems, das aus etwa 15 unterschiedlichen Proteinen besteht, liegt in der Detektion und Entfernung von fehlerhaften Basenpaaren in der DNA. Hauptsächlich entstehen diese in der Zelle durch Replikationsfehler der DNA-Polymerasen, aufgrund spontaner Basen-Deaminierung, -Oxidation bzw. -Methylierung (Modrich & Lahue, 1996; Umar & Kunkel, 1996), oder während der DNA-Reparatur (Iyer et al., 2006).

Auch chemisch induzierte DNA-Schäden, wie O⁶-Methylguanin und durch Cisplatin induzierte G-G Intrastrang-Verknüpfungen können von MMR-Enzymen (MSH2/6-Komplex) identifiziert werden (Duckett et al., 1996; Mello et al., 1996). Der Erkennung der Basenfehlpaarung folgt die Exzision aus dem DNA-Strang durch Rekrutierung des MLH1/PMS2-Proteinkomplexes, daraufhin werden Reparatursynthese und Ligation eingeleitet (Christmann et al., 2003).

Während in Prokaryoten zur Unterscheidung von korrektem und inkorrektem Strang, direkt nach der DNA-Replikation der Mutterstrang durch spezielle Enzyme methyliert und damit als korrekt gekennzeichnet wird (Wagner & Meselson, 1976), ist in Eukaryoten ein Mechanismus zur Unterscheidung der Stränge nicht bekannt.

Dies kann dazu führen, dass nicht reparierte O⁶-Methylguanin-Reste (siehe 1.2.1), zwar vom MMR-System als Fehlpaarung erkannt werden, dieses System dann aber in den (nicht beschädigten) Gegenstrang einschneidet. Die vergeblichen Reparaturversuche („futile repair“) können während der DNA-Replikation zu DNA-Doppelstrangbrüchen führen, wodurch letzten Endes die Apoptose eingeleitet wird (Kaina, 2004). So können verschiedene Reparaturwege, hier MGMT und MMR, auf die Zytotoxizität eines Schadenstyps und die Resistenzentwicklung Einfluss nehmen.

Wichtig ist das MMR-System vor allem für die Aufrechterhaltung essentieller Stammzellfunktionen, wie z.B. der Repopulationskapazität (Park & Gerson, 2005). Im Gegensatz zu Wildtypzellen konnten transplantierte Stammzellen aus dem Knochenmark von MMR-„knock-out“ Mäusen die Hämatopoese von bestrahlten Empfängertieren nicht wiederherstellen (Reese et al., 2003). Die wichtigste Funktion liegt allerdings in der Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität und genomischen Integrität der Zelle. So ist die häufigste genetische Krankheit eine spezielle Form des Darmkrebses (HNPCC „hereditary nonpolyposis colorectal cancer“), aber auch Lymphome und Leukämien sind auf Defekte im MMR-System zurück zu führen (Aaltonen et al., 1993; Lynch et al., 1993).

1.2.3 Basen-Exzisions-Reparatur

Über den Mechanismus der Basen-Exzisions-Reparatur (BER) können neben verschiedenen modifizierten Basen, wie z.B. N-alkylierten Purinen (7-Methylguanin, 3-Methyladenin, 3-Methylguanin) und deaminiertem Cytosin auch Oxidationsschäden (8-oxoguanin) beseitigt werden (Nilsen & Krokan, 2001). Diese Schäden können spontan auftreten oder endogen z.B. durch freie Radikale verursacht werden. Auch abasische Stellen (bzw. Apurin- [AP] Stellen) die durch Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung der Purine (und im geringen Ausmaß auch der Pyrimidine) entstehen, werden über diesen Mechanismus entfernt. Wenn sie hingegen unrepariert bleiben, so wirken sie hochgradig zytotoxisch und mutagen und können zu Einzelstrangbrüchen führen (Lindahl et al., 1972 & 1993; Nakamura et al., 1998;). Auch exogene Karzinogene wie Nitrosamine oder Chemotherapeutika wie DTIC oder Temozolomid können zu geschädigten Basen führen, die über die BER effektiv entfernt werden.

In Säugetierzellen sind über zehn verschiedene DNA-Glykosylasen wie z.B. MYH bekannt, die zum Teil hochspezifisch Basenmodifikationen erkennen und die betroffene Base durch hydrolytische Spaltung der N-glykosidischen Bindung entfernen (Schaerer & Jirincy, 2001). Die so entstandene abasische Stelle dient als Ansatzpunkt für die 5'-AP-Endonuklease (APE), welche die Phosphodiester-Bindung einschneidet und so zu einem DNA-Strangbruch führt.

In der „short-patch“ Reparatur wird durch die dRPase (DNA-Deoxyribophosphodiesterase) Aktivität von DNA-Polymerase β (Pol- β) der 5'-Deoxyribose-5'-Phosphat-(dRP) Rest entfernt und anschließend ein Nukleotid neu

eingesetzt. Die Ligation erfolgt anschließend über den DNA-Ligase III - XRCC 1 - Komplex (Cappelli et al., 1997; Dianov et al., 1992; Nash et al., 1997).

Bei der „long-patch“ Reparatur wird ein dRP-Rest, der nicht direkt entfernt werden kann (Gary, 1999), durch die Exzision eines Oligonukleotids durch die Pol- β (Dianov et al., 1999; Klungland et al., 1997) oder DNA-Polymerasen δ / ϵ entfernt (Matsumoto et al., 1999; Pascucci et al., 1999). Die abschließende Ligation erfolgt durch DNA-Ligase I oder III (Klungland et al., 1997).

Dabei können identische Läsionen in Abhängigkeit vom Zellzyklus über unterschiedliche Wege (short- vs. long-patch) repariert werden (Nilsen & Krokan, 2001).

Eine funktionierende BER scheint essentiell für Säugetiere, da alle Versuche, homozygote BER-„knock-out“ Mäuse zu etablieren, an der embryonalen Letalität gescheitert sind. Dies scheint daran zu liegen, dass die dPRase-Aktivität von Pol- β nicht durch andere Enzyme kompensiert werden kann (Dianov et al., 1999; Sobol et al., 2000). Daher ist, im Gegensatz zu anderen Reparaturwegen, kein humanes genetisches Syndrom bekannt, das auf einem Defekt dieser BER-Gene beruht (Park & Gerson, 2005).

1.2.4 Nukleotid-Exzisions-Reparatur

Durch das Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER)-System werden vor allem exogen induzierte DNA-Schäden beseitigt, die eine größere Störung der DNA-Doppelhelix erzeugen. Die für diesen Reparaturweg relevantesten DNA-Schäden sind die durch UV-Licht hervorgerufenen Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere und 6-4-Photoprodukte, durch DNA-reaktive Substanzen induzierte Inter- und Intra-Strang Quervernetzungen, sowie z.B. durch Benzpyren oder Aflatoxin hervorgerufene „unförmige“ („bulky“) Modifikationen (Fiedberg et al., 2001; Hanawalt, 2001; Mullenders & Berneburg, 2001).

Zwei Untersysteme der NER können dabei unterschieden werden (Hanawalt et al., 2003; Pastoriza Gallego & Sarasin, 2003):

Die Transkriptions-unabhängige Reparatur des gesamten Genoms (global genomische (GG)-NER) erfolgt über den XPC-hHR23B Komplex, der die DNA-Schäden erkennt, die Struktur der DNA-Doppelhelix verändert und die weiteren Reparaturenzyme rekrutiert (Masutani et al., 1994; Sugawara et al., 1998; Venema et al., 1990).

Bei der Transkriptions-gekoppelten (TC)-NER wird die DNA-Schädigung bei der Transkription aktiver Gene durch den RNA-Polymerase II-Komplex identifiziert, sobald

dieser auf die Läsion trifft. Dies führt zur Rekrutierung von CSA- und CSB-Proteinen (Hanawald, 2002).

Die weiteren Schritte der NER sind identisch und beginnen mit dem Multienzymkomplex TFIIH, dessen Untereinheiten XPB und XPD Helikase-Aktivität besitzen und so die DNA an der Stelle der Läsion aufwinden (Schaeffer et al., 1993 & 1994). Die Exzision eines 27-30 Nukleotide langen DNA-Fragments, das die Läsion enthält, erfolgt durch die Endonukleasen ERCC1/XPF und XPG (Sijbers et al., 1996). Die Auffüllung der Reparaturlücke erfolgt mit Hilfe der DNA-Polymerasen δ und ϵ , der anschließende Verschluss durch die DNA-Ligase I (Bohr et al., 1985; Mellon et al., 1987).

Der Ausfall einzelner NER-Enzyme führt zur Xeroderma pigmentosa (XP) mit extremer Photosensitivität und einer Prädisposition zum Hautkrebs. Dementsprechend wurden auch die NER-Gene XPA bis XPG benannt. Die hohe Inzidenz von Hautkrebs beruht auf den mutagenen Wirkungen von DNA-Photoprodukten nach Sonnenlichtexposition, die nicht repariert werden können (Cleaver, 2005). Bei dem Cockayne-Syndrom (CS) liegen andererseits Defekte von den bei der TC-NER benötigten Genen CSA oder CSB zugrunde (Andressoo & Hoeijmakers, 2005; van Hoffen et al., 1993). Diese Patienten zeigen schwere Entwicklungsstörungen und neurologische Ausfälle, haben allerdings kein erhöhtes Tumorrisiko (Nance & Berry, 1992). Hier führt die fehlende Reparatur aktiver Gene eher zu einer gesteigerten Apoptose-Rate und somit zum Zelluntergang, als zur Akkumulation von DNA-Schäden wie bei der XP.

1.2.5 Doppelstrangbruch-Reparatur

Von den vielen DNA-Schäden die durch endogene und exogene Faktoren verursacht werden sind Doppelstrangbrüche (DSB) die wahrscheinlich gefährlichsten, da sie durch Chromosomenaberrationen die genomische Integrität am meisten gefährden und außerdem ein hohes zytotoxisches Potential besitzen (Dikomey et al., 1998; Lips & Kaina, 2001; Pfeiffer et al., 2004).

Induziert werden sie z.B. durch freie Sauerstoff-Radikale, ionisierende Strahlung und bei einer DNA-Replikation die über einen Einzelstrangbruch hinweg erfolgt (Hoeijmakers, 2001). Andererseits entstehen regelmäßig endogene DSB bei der V(D)J-Rekombination und bilden so die Basis für die Antigenvielfalt der Immunglobuline (Fugmann et al., 2000; Lieber et al., 2004).

Für die Reparatur gibt es zwei verschiedene Wege, die in Abhängigkeit vom Zellzyklus aktiv werden. Einerseits durch „non-homologous end-joining“ (NHEJ) bei ruhenden Zellen in der G₁/G₀-Phase des Zellzyklus (Cromie et al., 2001; Haber, 2000), andererseits die homologe Rekombination (HR), die in der S- und G₂-Phase vorherrscht (Johnson & Jasin, 2000; Takata et al., 1998) (Abb. 4).

Durch das NHEJ werden die benachbarten Enden eines DSB miteinander verbunden (Lieber et al., 2004). Dazu bindet am Anfang ein Heterodimer aus Ku70 und Ku80 an die freien DNA-Enden und rekrutiert die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Protein-Kinase (DNA-PKcs). Die Prozessierung des DSB erfolgt durch einen Komplex aus DNA-Ligase IV und XRCC4 (Critchlow et al., 1997; Li et al., 1995;). Da bei diesem Reparaturweg keine Sequenzhomologie notwendig ist, ist das NHEJ relativ fehleranfällig, außerdem gehen häufig mehrere Nukleotide während des Reparaturvorgangs verloren. Im Gegensatz dazu arbeitet die HR fehlerfrei, da eine DNA-Sequenz auf dem Schwesterchromatid als Vorlage verwendet wird (Wyman et al., 2004). Die Erkennung des DSB erfolgt durch die Protein-Kinase ATM („ataxia telangiectasia mutated“), die daraufhin eine Reihe von DNA-Reparaturfaktoren und Zellzyklus-Regulatoren aktiviert (Kurz & Lees-Miller, 2004; Suzuki et al., 1999; Yang et al., 2004). Es folgt die Nukleotid- Resektion in 5'-3' Richtung durch einen Komplex aus RAD50, Mre11 und Nbs1. RAD52 bindet nun an die DSB-Enden und RAD51 interagiert mit einem unbeschädigten DNA-Molekül. Sobald eine homologe Region gefunden ist, katalysieren sie den Strang-Austausch. Dieser Ablauf wird zusätzlich von RPA („replication protein A“) beeinflusst (Petukhova et al., 1998). DNA-Polymerase kopiert die Informationen des unbeschädigten Partnerstrangs und die Enden werden durch DNA-Ligase I verknüpft, anschließend folgt die „branch migration“ und die Auflösung der entstandenen „Holliday“-Struktur (Constantinou et al., 2001; Wyman et al., 2004).

Eine Mutation, die zum Ausfall von ATM führt, hat die autosomal rezessiv vererbte Krankheit Ataxia teleangiectatica (AT) zur Folge, die durch erhöhte Strahlungs-Sensitivität, Immundefizienz und ein hohes Leukämie- und Krebs-Risiko gekennzeichnet ist (Lavin et al., 2005). Ein Ausfall von ATR (einem dem ATM ähnlichen Protein) führt bei Mäusen zu embryonaler Letalität (Brown & Baltimore, 2000).

Ist der NHEJ-Prozess beschädigt, kommt es hingegen zu einer schweren Immundefizienz (SCID-Phänotyp) durch eine gestörte Lymphozyten-Entwicklung (Schwarz et al., 2003) und einer erhöhten Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung (Riballo et al., 1999). Viele maligne Erkrankungen des lymphatischen Systems sind auf

chromosomale Schäden zurück zu führen, die aufgrund einer fehlerhaften DSB-Reparatur während der V(D)J-Rekombination entstanden sind (Korsmeyer, 1992; Rabbitts, 1994; Vanasse et al., 1999).

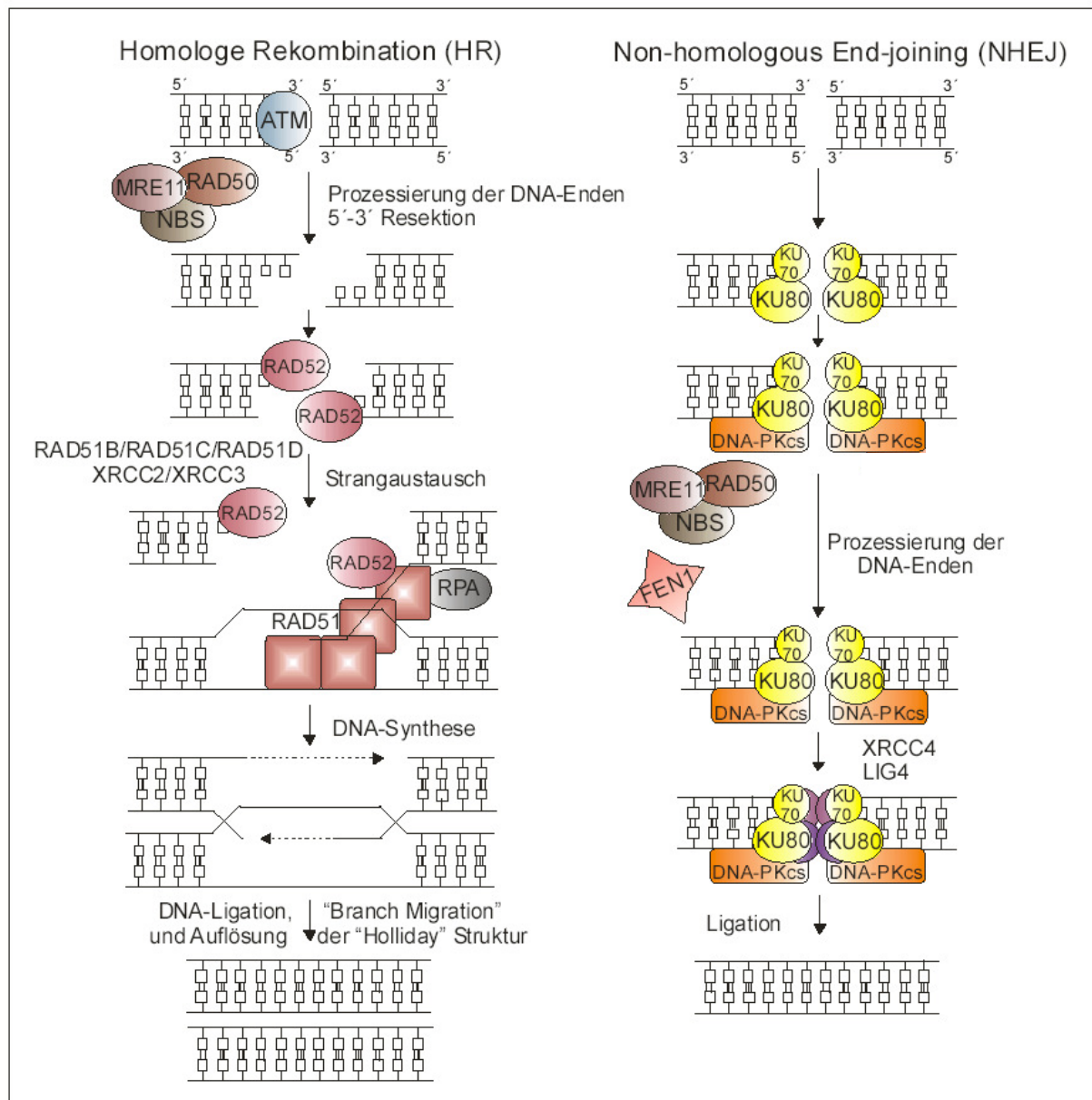


Abb. 04: Überblick über die verschiedenen Reparaturwege bei der Prozessierung von Doppelstrangbrüchen. Homologe Rekombination (HR) und „non-homologous end-joining“ (NHEJ). (Modifiziert von T. Bracker (IFZ) nach Christmann et al., 2003 und Sancar et al., 2004)

1.3 Chronisch lymphatische Leukämie und DNA-Reparatur

Von den zuvor beschriebenen Reparaturwegen sind die meisten in etablierten Zellkultursystemen oder murinen Modellen gut untersucht. Allerdings wird die Untersuchung einzelner Reparaturwege dem komplexen Netzwerk ineinander greifender Reparaturmechanismen, die wiederum mit einer Vielzahl anderer biochemischer und genetischer Funktionen der Zelle interagieren, nicht gerecht (Barrett & Hill, 1998; Friedberg et al., 1995). So zeigt sich, dass die Reparatur von DNA-Schäden innerhalb eines Genoms mit unterschiedlicher Effizienz ablaufen kann, z.B. in Abhängigkeit der Zellzyklus-Phase (Johnson & Jasin, 2000) oder einer laufenden Transkription (Link et al., 1992; May et al., 1993; Thomale et al., 1994b).

Da die verwendeten Zell-Linien oder murinen Zellen häufig keine primären Tumorzellen sind, gibt es durch die unterschiedliche Herkunft und die oft unzureichende Charakterisierung der Zellen eine große biochemische und genetische Varianz. Auch kommt es bei Zell-Linien häufig zur Ausbildung von resistenten Sub-Klonen, die zu widersprüchlichen Ergebnissen führen, so dass die Relevanz der Resultate für die klinische Situation nur schwer zu beurteilen ist.

Eine wichtige Voraussetzung bei der Planung dieser Arbeit war daher die Festlegung auf ein geeignetes Modell primärer Tumorzellen des Menschen, um eine kausale Verknüpfung von DNA-Reparatur und Resistenz-Entwicklung aufzeigen zu können. Daher wurde als klinisches Modell zur Untersuchung dieser Zusammenhänge die chronisch lymphatische Leukämie (CLL) gewählt, die im Folgenden vorgestellt wird.

Die CLL ist mit 31 % die häufigste Form der Leukämie (Non-Hodgkin-Lymphom) im Erwachsenenalter in der westlichen Welt. Die Inzidenz liegt bei 3 pro 100.000 Einwohner. Mit einem Altersmedian von 70 Jahren ist sie vor allem eine Erkrankung des höheren Lebensalters. Während die CLL vor dem 40. Lebensjahr sehr selten ist, steigt die Inzidenz mit zunehmendem Alter rasch an (Havlik et al., 1994). Bisher sind keine Umwelteinflüsse (z.B. ionisierende Strahlung oder karzinogene Substanzen) bekannt, die die Entstehung einer CLL begünstigen (Yanagihara et al., 1998).

CLL-Lymphozyten sind in 95 % der Fälle monoklonale, immuninkompetente B-Zellen (in 5 % T-Zellen), die im peripheren Blutaussstrich morphologisch wie reife Lymphozyten

erscheinen und vom Reifungsgrad zwischen den Prä-B-Zellen und den reifen B-Zellen liegen.

Dabei liegt der Akkumulation von B-Zellen nicht eine gesteigerte Proliferation eines malignen Klons, sondern oft eine Überexpression anti-apoptotischer Gene zugrunde, wodurch die Zellen dem programmierten Zelltod entgehen und in der G₁/G₀-Phase des Zellzyklus arretiert sind (Caligaris-Cappio, 2000; Granziero et al., 2001; Hanada et al., 1993).

Auch wenn einige B-CLL-Fälle chromosomale Translokationen zeigen, gibt es bisher keine kennzeichnende wiederkehrende genomische Alteration, sondern eher eine allgemeine genomische Instabilität, die gehäuft zu Chromosomen-Aberrationen führt (Stilgenbauer et al., 2000).

Klinisch zeigen die Patienten mit CLL einen sehr variablen Verlauf. Während in ca. 30 % der Fälle trotz langen Krankheitsverlaufs nie eine Behandlung notwendig ist, kommt es bei anderen zu einer raschen Progredienz, die eine sofortige Therapie notwendig macht (Dighiero & Binet, 2000).

Die Standardbehandlung besteht in der palliativen Chemotherapie mit alkylierenden Substanzen wie Chlorambucil oder Cyclophosphamid, zum Teil in Kombination mit Kortikosteroiden, Adriamycin oder Vincristin. Chlorambucil weist neben seiner guten Wirksamkeit eine gute Verträglichkeit auf und kann bei vielen Patienten über einen langen Zeitraum eingesetzt werden (Dighiero et al., 1998). Die im Krankheitsverlauf auftretende Resistenz gegen die initiale Medikation erfordert die Behandlung mit alternativen Therapien. Deren Wirkungsweise sollte sich von den bisher eingesetzten Medikamenten, die zur Resistenzentwicklung geführt hat, unterscheiden.

So erfolgt die Therapie bei Patienten, die nicht mehr auf die initiale Chemotherapie ansprechen, mit dem Purin-Analogon Fludarabin und 2-chlorodeoxyadenosin plus Deoxycoformycin (ein Inhibitor der Adenosin-Deaminase) (Rai et al., 2000). Neue Therapieoptionen sind unter anderem Rituximab und Alemtuzumab (anti-[CD20]- bzw. [CD50]-Antikörper) (Keating et al., 2002a & 2002b) und die allogene Knochenmarks-Transplantation (Keating, 2001; Kipps, 2002).

Die im Vergleich mit nahezu allen epithelialen Tumoren anfangs gute Ansprechrate von CLL-Patienten auf die Chemotherapie zeigt die initiale Sensitivität der malignen B-Zellen gegenüber DNA-schädigenden Substanzen (Buschfort et al., 1997; Myllyperkio et al., 2000). Im weiteren Verlauf kommt es häufig zu einer Resistenzentwicklung gegenüber

zytotoxischen Substanzen (Bosanquet & Bell, 1996), wobei durch *in vitro* Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass die klinische Resistenz gleichbedeutend mit zellulärer Resistenz ist (Bramson et al., 1995; Silber et al., 1994).

Die CLL bietet einige Vorteile, die diese Tumorerkrankung zu einem gut geeigneten Modellsystem zur Untersuchung von DNA-Reparaturmechanismen bei der Resistenz-Entwicklung in der Tumorthherapie machen:

- homogene Populationen primärer CLL-Lymphozyten sind aus dem peripheren Blut leicht zu isolieren
- gute Charakterisierbarkeit der Zellen anhand von Zelloberflächen-„Markern“
- Arretierung der Tumorzellen in der G₁/G₀-Phase des Zellzyklus
- Resistenzentwicklung gegenüber DNA-reaktiven Substanzen, nach zunächst gutem Ansprechen auf die Therapie
- Korrelation von klinischer und zellulärer Resistenz gegenüber Chlorambucil

1.4 Das DNA-Reparatur-Netzwerk (Aufgabenstellung)

Die vielfältigen Möglichkeiten einer Tumorzelle DNA-Schäden zu reparieren zeigen, dass der Anteil der prozessierenden DNA-Reparaturwege und die gesamte Reparaturkapazität bekannt sein müssen, um einen optimalen zytotoxischen Effekt der Chemotherapie zu ermöglichen.

Die intensive Erforschung von DNA-Reparaturprozessen zeigt bei Pro- und Eukaryoten ein komplexes Netzwerk ineinander greifender Reparaturmechanismen, die wiederum mit einer Vielzahl anderer biochemischer und genetischer Funktionen der Zelle interagieren.

Da die meisten Forschungen mit abgeleiteten Zelllinien oder murinen Zellen erfolgen oder sich auf einzelne Reparaturwege konzentrieren, sind für primäre humane Zellen die komplexen Regulationsmechanismen des DNA-Reparatur-Netzwerks nicht vollständig bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, anhand von Genexpressionsanalysen den Stellenwert der einzelnen Reparaturwege zu ermitteln sowie genetische Verknüpfungen und Regulationsmechanismen im Sinne eines „DNA-damage response networks“ aufzuzeigen. Weiterhin sollte die Kapazität von CLL-Lymphozyten zur Reparatur zytotoxischer DNA-Läsionen bestimmt werden und mit der individuellen Reparaturantwort auf Transkriptionsebene korreliert werden.

Diese Untersuchungen sollen dazu beitragen in Zukunft die koordinierte Zellantwort auf DNA-Schäden besser zu verstehen und so durch eine optimierte Chemotherapie bessere Behandlungsergebnisse zu ermöglichen.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alkylanzien: *N*-Ethyl-*N*-Nitrosoharnstoff (EtNU) von Serva (Heidelberg), Melphalan von Sigma (Deisenhofen) und Cisplatin als „Platinex“-Lösung von Bristol Arzneimittel (München).

Antikörper: Monoklonaler Antikörper (MAK): 7-26 Maus IgG anti-[Deoxycytidine] von Chemicon International (Temecula, USA). Zweit-Antikörper: IgG F[ab]₂-Fragmente Ziege anti-[mouse IgG] Antikörper, markiert mit ALEXA FLUOR 488 (Affinitätsgereinigt und gegen Rinder-, Ziegen-, Menschen-, Hasen- & Ratten-IgG ausselektiert) von Molecular Probes (Leiden, Niederlande). Verwendete Antikörper zur Zellseparation: Anti-CD19 von Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach) und Rosette Sep von Stem Cell Technologies (Vancouver, Kanada).

DNA Farbstoffe: 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) und Ethidiumbromid von Merck (Darmstadt), SYBRTM Green I von MoBiTec (Göttingen) bezogen. Eindeckmittel: Pro-Long Anti-FadeTM von Molecular Probes (Leiden, Niederlande).

Chemikalien für die Molekularbiologie: Verwendetes Wasser: H₂O (HPLC-Reinheitsgrad) von Merck (Darmstadt) oder Ampuwa von Fresenius (Bad Homburg). Enzyme: T7 Polymerase von Becton Dickenson (Heidelberg), RNase T1 und RNase A, sowie Proteinase K von Boehringer (Mannheim), DNase von Qiagen (Hilden). Cy3- und Cy5-Aminoallyl-UTPTM von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg); Oligo (dT)₂₀ Primer von MWG-Biotech AG (Ebersberg). RNase Away von Molecular BioProducts (Leiden, Niederlande) bzw. RNase Zap von Ambion (Austin, Texas, USA).

Agarosen: Seakem LE und NuSieve GTG für die Einzelzell-Elektrophorese und Biozyme DNA Agarose für den Plasmid-Relaxations-Assay stammten von FMC Bioproducts, Biozyme, Hameln.

Kits: RNeasy Total RNA (Mini & Midi) Kit von Qiagen (Hilden); PAXgene Blood RNA Kit von PreAnalytiX (Hombrechtikon, Schweiz); High Pure RNA Tissue Kit von Roche (Mannheim), RiboGreen RNA-Quantifizierungs Kit von Molecular Probes (Leiden,

Niederlande); Megascript T7 Kit von Ambion (Austin, Texas, USA); cDNA Synthesis System von Roche (Mannheim).

Verbrauchs-Chemikalien: EDTA (Titrplex II), Ethanol (97 %), DMSO (Dimethylsulfoxid), Glycerin, HEPES, Methanol, Silikonlösung und Tris von Merck (Darmstadt). Bromphenolblau, Xylencyanol, Triton-X-100, DNase freies Rinderserumalbumin (BSA), Morpholin-Ethan-Sulfonsäure (MES) NaCl und NaOH, stammten von Serva (Heidelberg); Casein, DEPC (Diethyl-Pyrocbonat), Formamid und SDS (Natrium-Dodecylsulfat) von Sigma (Deisenhofen). Sämtliche Substanzen wiesen mindestens den Reinheitsgrad „pro analysi“ (p.a.) auf. Milchpulver von Spinnrad (Gelsenkirchen).

Verbrauchs-Materialien: Sterilfilter von Schleicher & Schuell (Dassel), Mikrotiterplatten von Greiner (Nürtingen). Zellkultur-Röhrchen von Renner (Konstanz), 96er Mikrotiter-Platte von Limbro Division Flow Laboratories (Hamden, Connecticut USA). Sterile Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße von MoBiTec (Göttingen); Oberflächen-optimierte Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße von Nerbe Plus (Winsen). Vacutainer™ Whole Blood Tubes mit Heparin CPT™ von Becton Dickenson (Heidelberg).

2.1.2 Puffer und Lösungen

2.1.2.1 Puffer und Lösungen für Nitrosoharnstoffe

EtNU (100 mg/ml) und Melphalan (1 mg/ml) wurden als Stamm-Lösung in DMSO bei -20°C aufbewahrt. Cisplatin wurde aus der käuflichen frischen Infusionslösung verdünnt. Da EtNU in wässriger Lösung wenig stabil ist (Halbwertszeit < 9 Minuten, Goth & Rajewsky, 1972) wurde die Konzentration vor dem Gebrauch spektrophotometrisch in MES-Puffer bestimmt, die darauf folgende Inkubation der Zellen erfolgte in Alkylierungspuffer. Melphalan und Cisplatin wurden direkt vor der Inkubation verdünnt in RPMI 1640-Medium supplementiert mit 1 mM Glutamin, 1 mM Pyruvat, 1 mM nicht-essentiellen Aminosäuren und 8 µg Refobazin/ ml.

MES-Puffer

(pH 7.25)	60 mM NaCl
	1 mM 2-Morpholin-Ethan-Sulfonsäure
	0.5 mM EDTA

AlkylierungspufferPBS⁺⁺ mit 25 mM HEPES**2.1.2.2 Lösungen und Medien für die Zellkultur**

RPMI-1640 Medium und Trypsin-Lösung (2.5 g/l in PBS) von Gibco (Eggenstein), fötales Kälber-Serum (FBS) von Seromed (Berlin), Trypanblau-Färbelösung, Glutamin, Pyruvat und essentielle Aminosäuren von Merck (Darmstadt).

PBS

(pH 7.25) 137 mM NaCl
2.7 mM KCl
8.1 mM Na₂PO₄
1.5 mM KH₂PO₄

PBS⁺⁺PBS mit 0.9 mM CaCl₂**MACS-Puffer**

PBS mit 0,5 % FBS
2 mM EDTA
0.49 mM MgCl₂

Einzellzell-Elektrophorese:**Lyse-Puffer**

(pH 10) 2.5 M NaCl
100 mM EDTA
10 mM Tris
1 % (w/v) n-Laurylsarkosin
10 % (v/v) DMSO
1 % (v/v) Triton-X-100

Elektrophorese- Puffer

(ph 12) 300 mM NaOH
10 mM Tris
1 mM EDTA

Neutralisations-Puffer

(pH 7.5) 0.4 M Tris-HCl

Einzelzell-Immunfärbung:

Blocking-Lösung

PBS mit 1 % (w/v) Casein, Milchpulver, oder BSA

BSA-PBS (Antikörper-Inkubationslösung)

PBS mit 5 % (w/v) BSA

MAK-Waschlösung

PBS mit 0.01 % (v/v) Tween 20

2.1.2.3. Puffer und Lösungen für biochemische Zwecke

Alle Lösungen wurden mit DEPC-Wasser hergestellt und anschließend autoklaviert. DEPC ist ein potenter RNase-Inhibitor. H₂O (mit HPLC-Reinheitsgrad) wurde mit 0.1% (v/v) DEPC versetzt und geschüttelt und nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden bei 37°C autoklaviert (3 bar, 30 min), um jeden Rest von DEPC zu beseitigen und damit eine Carboxyethylierung der RNA-Proben zu verhindern.

Elektrophorese :

50x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA)

(pH 7.5) 2 M Tris-Base
 2 M Essigsäure
 50 mM EDTA

6x Lade-Puffer

15 % (v/v) Ficoll
3% (w/v) SDS
0.25 % (w/v) Bromphenolblau
0.25 % (w/v) Xylolcyanol FF
6 mM EDTA

Ribo-Green-Quantifizierung:

20x TE-Puffer

(pH 7,5) 200 mM Tris-HCl
 20 mM EDTA

RNA-Amplifikation:

20x SSC

3 M NaCl
300 mM Na-Citrat

10x SDS

5x Fragmentierungs-Puffer

(pH 8.1) 20 mM Tris-Acetat
 50 mM KO-Acetat
 15 mM MgO-Acetat

Hybridisierungs-Puffer

(pH 8.0) 50 mM Na-Phosphat
 50 % (v/v) Formamid (deionisiert)
 6x SSC
 5x Denhardts Solution
 0.5 % SDS

Blocking-Lösung

4x SSC
0.5 % SDS
1 % (w/v) BSA

Waschpuffer I-III

I	2x SSC, 0.1 % SDS
II	1x SSC
III	0.5x SSC

2.1.3. Geräte

Array:	MWG-Biotech HPSF [®] OligoChip (MWG-Biotech AG; Ebersberg)
Autoklave:	Fedegano (Albuzzano, Italien)
Bildanalyse:	Mikroskop: Fluoreszenz Photo-Mikroskop „Axioplan“ (Zeiss) mit Quecksilberlampe HBO 100 W als Lichtquelle, Standard Filter-Kombination mit den Filtern Zeiss 2, Zeiss 14 und Zeiss 15. Kamera: CCD Kamera (Photonics, Hamamatsu City, Japan) und Vier-Parameter Bildanalyse-Programm (ACAS, Ahrens Cytometry Analysis System; Ahrens Electronics, Bargteheide).
Elektrophorese:	Midi-Kammer (Bio-rad, München) mit Elektrophoresis Powersupply (Renner, Konstanz), UV-Transilluminator (Bachofer, Reutlingen) und CCD-Kamera mit Auswertesystem (MWG-Biotech AG; Ebersberg).
ELISA-Reader:	“Dyantech 4000” (Dyantech, Hamburg) und “FL 500- Microplate Fluorescence-Reader” mit FL 500 Software Version 1D1 (Bio-Tek Instruments, Hamburg)
Hybridisierungs-Kammer:	(MWG-Biotech AG; Ebersberg)
Licht-Mikroskop:	Will (Wetzlar)
Mehrfachfiltrations-Gerät:	(Hölzel) mit Vakuum-Pumpe „Vacuskan“ (Skan).
Speed Vac:	Konzentrator (Savant) mit Kühlfalle „Refrigerated Condensation Trap RT 100“ (Savant), Vakuum Pumpe „High Vacuum Pump Model Serial“ (Edwards) und Vorfilter „Model VPOF-100 (Savant).
Spektralphotometer:	„Modell 150-20“ (Hitachi, Japan).
Thermocycler:	(Roth, Karlsruhe)
Überkopfschüttler:	„Rotator Drive STR4“ (Stuart Scientific).
Vortex:	Janke & Kemkel, IKA-Labortechnik
Waage:	Mettler „AE 100“ und „Kern 440-45“ (Göntgen).
Wasserbäder:	37°C bzw 42°C; Roth (Karlsruhe).
Zentrifugen:	„Tisch-Zentrifuge 5412“ (Eppendorf); „202 MK“ (Sigma); „Minifuge T“, „Megafuge 1.0“ und Tisch-Zentrifuge „Christ“ (Heraeus).

2.1.4 Software

Bildanalyse:

Vier-Parameter Bildanalyse-Programm (ACAS, Ahrens Cytometry Analysis System; Ahrens Electronics, Bargteheide).

Clusteranalyse:

Gene Cluster & Tree View (Michael Eisen; Stanford University)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Isolierung von Lymphozyten aus Vollblut

Lymphozyten wurden aus peripherem Blut isoliert durch auftragen von heparinisiertem Blut auf „Cell Preparation Tubes“ (CPT) und einer Dichte-Gradienten-Zentrifugation (20 min, 1600x g, RT, ohne Bremse). Die Lymphozyten wurden aus der Interphase entnommen, gezählt, zweimal mit PBS gewaschen und entweder in vorgewärmtem, supplementiertem RPMI 1640-Medium (für *in vitro*-Experimente) oder in RLT-Puffer (für die RNA-Isolierung) resuspendiert. Die so gewonnene Zell-Fractionen bestanden zu >90% aus Lymphozyten (Licht-Mikroskopie), waren zu >95% vital (Trypanblau-Färbung) und befanden sich zu >95 % in der G₁/G₀-Phase des Zell-Zyklus (FACS Analyse).

Bei allen klinischen Proben von Patienten wurde bei der ersten Untersuchung durch Immuno-Typisierung der Zell-Typ bestimmt. Zur Zeit der Blutentnahme standen die Patienten nicht unter Therapieeinfluss. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden ausschließlich B-CLL-Zellen eingesetzt.

2.2.1.2 B-Zell-Isolierung

Die Isolierung von CD19⁺-Zellen erfolgte mit Hilfe von magnetischen Miltenyi-MicroBeads. Nach der oben beschriebenen Zell-Isolierung wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt indem die resuspendierten Zellen durch eine mit MACS-Puffer (PBS mit 0,5% FBS und 2 mM EDTA; pH 7,2) befeuchteten Nylon-

Membran gegeben wurden. Danach wurde die Zellzahl auf 10^7 Zellen in 80 μ l Puffer eingestellt und 15 min bei 4°C mit einer fünffach konzentrierten Antikörpersuspension inkubiert (Miltenyi anti-[CD19] monoklonale Maus IgG1 mit gekoppelten MicroBeads).

Die Zellen wurden danach vorsichtig mit (20-fachem Volumen) Puffer gewaschen, zentrifugiert (10 min, 300x g) und in 500 μ l MACS-Puffer je 10^8 Zellen resuspendiert. Es folgte eine positive Selektion in einem zuvor mit Puffer gewaschenes Separations-Röhrchen im magnetischen Feld eines MACS-Seperators:

Durch mehrmaliges Waschen wurde sichergestellt, dass alle nicht-CD19 Zellen das Röhrchen passiert hatten. Das Röhrchen wurde dann aus dem Magnetfeld entfernt und die CD19-positiven Zellen in ein neues Tube eluiert.

Die magnetisch markierten Zellen konnten für die Qualitätskontrolle oder weitergehende Analysen mit Fluorochrom-konjugierten CD19-Antikörpern gefärbt werden, da MACS MicroBeads submikroskopisch sind und so nicht die Lichtstreuung der markierten Zellen beeinflussen. Die Reinheit der sortierten Zell-Fraktion wurde mit einer Durchflußzytometrie bestimmt (ca. 80 bis 95 %).

Alternativ wurden Blutproben direkt nach der Blutentnahme mit dem RosetteSep™-Antikörper-Mix versetzt, 20 min bei Raum-Temperatur inkubiert und mit dem gleichen Volumen an PBS + 2 % FBS vermischt. Dadurch wurden alle nicht-CD19 Oberflächen-Antigene gebunden und mit anti-Erythrozyten-Antikörpern vernetzt. Nach einer Dichte-Gradienten-Zentrifugation in den oben genannten „CPT“-Gefäßen (20 min, 1600 g, RT, ohne Bremse) konnten die nicht-gebundenen, angereicherten B-Lymphozyten aus der Interphase entnommen, gezählt und anschließend gewaschen und weiterverwendet werden (Reinheit ca. 70-90%).

2.2.1.3 Kultivierung der Zellen („Liquid holding“)

Die Kultivierung der isolierten Zellen fand in H₂O-gesättigter Atmosphäre bei 5 % CO₂ und 37° C statt. Das dazu verwendete RPMI 1640-Medium wurde supplementiert mit 10 %(v/v) fötalem Kälber-Serum, 1 mM Glutamin, 1 mM Pyruvat, 1 mM nicht-essentiellen Aminosäuren und 8 μ g Refobazin/ml.

Die Blutproben von Patienten wurden ausschließlich vor einer eventuellen Chemotherapie verwendet. Sie wurden jeweils frisch gewonnen und die Experimente am selben Tag durchgeführt.

2.2.1.4 Alkylierung von Zell-Suspensionen

Die Zellsuspensionen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener Alkylantien (EtNU, Melphalan, Cisplatin) im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂, gesättigte H₂O-Atmosphäre) in RPMI 1640 (bei EtNU die ersten 20 min in Alkylierungspuffer (pH 7,25) inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Aliquots zur weiteren Auswertung entnommen. Diese wurden einmal mit PBS gewaschen und dem Comet Assay zugeführt oder in PBS / Ethanol (70 %) bei –20°C fixiert.

2.2.1.5. Einzelzell-Gelelektrophorese zur Bestimmung von DNA-Strangbrüchen („Comet Assay“)

DNA-Strangbrüche wurden mit Hilfe der Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay) quantifiziert (Singh et al., 1988; Buschfort et al., 1997). Nach der EtNU-Exposition wurden jeweils 5×10^4 Zellen in Low-Melting-Point (LMP)-Agarose (100 µl; 0.5 %) suspendiert und auf angerauhte Objektträgern gebracht, die zuvor mit einer dünnen Schicht 0.7 % LE-Agarose (Volumen 350 µl) beschichtet waren. Mit Hilfe eines Deckglases wurde die Zellsuspension gleichmäßig verteilt. Danach wurde mit 100 µl LMP-Agarose eine ebenfalls geglättete Deckschicht aufgetragen. Zwischen dem Auftragen der einzelnen Schichten wurden die Objektträger zum Aushärten der Agarose für jeweils 5 min bei 4° C gelagert.

Anschließend wurden die Zellen durch Inkubation der Objektträger in einem Lyse-Puffer (16 h bei 4° C) lysiert, durch zweimaliges Waschen entsalzt (Elektrophorese-Puffer; pH 12) und zur DNA-Denaturierung in dieser Lösung inkubiert (20 min bei 4° C). Danach wurde die DNA unter diesen Bedingungen elektrophoretisch getrennt (20 min bei 4° C und 4 V/cm), in Tris-Puffer neutralisiert (3 x 10 Minuten bei RT) und abschließend mit Ethidiumbromid (2 µg/ml) gefärbt.

2.2.1.6 Bestimmung von abasischen Stellen und DNA-Strangbrüchen

Die Häufigkeit abasischer Stellen und Einzelstrangbrüche in der Kern-DNA einzelner Zellen wurde durch Messung der elektrophoretischen Mobilität im Agarose-Gel bestimmt („Comet-Bildung“). Diesem Verfahren liegt zu Grunde, dass durch Reparatur-Einschnitte entstandenen DNA-Fragmente eine stärkere Beweglichkeit besitzen als ungeschädigte,

langkettige DNA. Durch die Messung der Gesamt-Fläche der Kern-DNA einzelner Zellen über den Bereich der detektierbaren (Ethidiumbromid-) Fluoreszenz konnte der Grad der DNA-Schädigung bestimmt und als relative Flächenvergrößerung quantifiziert werden. Dabei wurde die Fläche der Kern-DNA exponierter Zellen bezogen auf die Kern-Fläche unbehandelter Kontroll-Zellen (also ungeschädigter DNA) desselben Spenders im gleichen Experiment.

2.2.1.7 Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen (MAK-Test)

Die Zell-Proben wurden nach einer Fixierung und Lagerung über Nacht bei -20°C abzentrifugiert (1500 rpm, 5 min) und in 250 µl Formamid (FA) resuspendiert. FA erniedrigt die Stabilität apoptotischer DNA gegenüber erhöhter Temperatur durch die Proteolyse DNA-bindender Proteine (v.a. Histone). Die Inkubation erfolgte für 5 min bei Raumtemperatur und anschließend für 10 min im 75°C Wasserbad. Danach wurden unspezifische Bindungsstellen mit Blocking-Lösung 15 min bei Raum-Temperatur im Wasserbad neutralisiert und die Zellen nachfolgend mit dem Antikörper F 7-26 (5 µg in 100 µl BSA-PBS) inkubiert, F 7-26 bindet spezifisch an Einzelstrang (ss)-DNA in kondensiertem Chromatin apoptotischer Zellen von mindestens 25 Basenpaar-Länge, nicht jedoch an ssDNA nekrotischer oder mitotischer Zellen oder an dsDNA (Frankfurt & Krishan, 2001). Nach je einem Waschschrift mit MAK-Waschlösung und BSA-PBS erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper (Ziege anti-Maus IgG (H+L) [ALEXA 488] 4µg in 100 µl BSA-PBS). Abschließend folgte eine Behandlung mit RNase T1 (50 U/ml) und RNase A (200 µg/ml) und DAPI (0,1 µl/ml in PBS und 10 min). Die Waschschriffe wurden mit PBS durchgeführt. Das verbleibende Zell-Pellet wurde in 10 µl resuspendiert, auf einen Objektträger pipettiert und mit einer Fluoreszenz-Erhaltungsemulsion (ProLong-Antifade) eingedeckt.

2.2.1.8 Immunofluoreszenz-Messung der Kern DNA

Die Fluoreszenz-Signale einzelner Zellen wurden mit Hilfe eines Fluoreszenz-Photomikroskops (Zeiss Axioplan) mit der Filter-Kombination 2 (für DAPI Exzitations-Maximum 364 nm; Emissions-Maximum 454 nm) und 15 (für ALEXA 488; Exzitations-Maximum 491 nm, Emissions-Maximum 515 nm) gemessen, mit einer CCD-Kamera aufgenommen, amplifiziert und einem Vier-Parameter Bildanalyse-Programm (ACAS)

zugeführt. Das Programm integrierte die Fluoreszenz-Signale auf Einzelzell-Ebene mit automatischer Subtraktion der Hintergrund-Fluoreszenz. In jeder Probe wurden mindestens 100 Zellen ausgewertet.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 RNA Isolierung mit Qiagen RNeasy Kit

Je 1×10^7 Zellen wurden mit stark denaturierendem und RNase inaktivierenden RLT-Puffer lysiert (enthält Guanidin-Isothiocyanat und β -Mercaptoethanol). Zur Homogenisierung wurde das Lysat mehrfach durch eine Kanüle (27G) gezogen, um mit Hilfe der Scherkräfte die Viskosität des Lysats zu erniedrigen und die zelluläre RNA freizusetzen. Nach Zugabe von Ethanol (70 %) bindet die RNA in Gegenwart eines chaotropen Salzes (Guanidinium-HCl) selektiv an das Glasfaservlies der Spin Columns. Nach einem Wasch-Schritt mit RW1-Puffer (enthält Guanidinium-HCl), wurde kontaminierende Rest-DNA durch DNase I (20 μ l, 55 U), die auf das Glasfaservlies zugegeben wurde, verdaut. Die anschließenden Waschschrte mit RW1- und RPE-Puffer (enthält Ethanol (76,8 %), entfernen kontaminierende, zelluläre Komponenten (insbesondere Proteine), während die RNA gebunden bleibt. Die Membran wurde nach dem zweiten Auftragen von RPE-Puffer durch Zentrifugation (2 min, 14000 rpm) getrocknet und die RNA zweimal mit 50 μ l RNase-freiem H_2O eluiert. Diese Methode vermeidet RNA-Fällung und die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln. Die RNA wurde bei -70°C gelagert.

2.2.2.2 Isolierung von mRNA aus Vollblut (PAXgene Blood RNA Kit)

Peripheres Blut wurde direkt mit PAXgene Blood RNA Tubes entnommen, geschüttelt und mindestens zwei Stunden bei RT inkubiert, um eine komplette Zell-Lyse zu erreichen. Die RNA wird durch die Inhaltsstoffe des Röhrchens stabilisiert und Veränderungen des Expressions-Profiles, die normalerweise *in vitro* nach der Blutentnahme stattfinden, werden verhindert. Die Isolation begann mit einer Zentrifugation (4500g, 10 min), um die Nukleinsäuren zu pelletieren. Das Pellet wurde mit RNase-freiem Wasser gewaschen und in BR-1-Puffer resuspendiert. Zum Protein-Verdau wurde das Pellet zusammen mit Bindungspuffer (enthält Guanidin-Isothiocyanat)

und Proteinase K 10 min bei 55°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Eine zusätzliche Zentrifugation (3 min, 10.000g) diente dazu Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde mit Ethanol (96 %) gemischt, um die RNA des Lysats an die Matrix der Spin Column zu binden. Durch eine kurze Zentrifugation (1 min, 10.000 g) wurde die RNA selektiv an die PAX-gen Silizium-Gel Membran gebunden, während Verunreinigungen die Membran passieren. Verbleibende Verunreinigungen wurden mit zwei effizienten Wasch-Schritten (BR3- (enthält Guanidin-Isothiocyanat), BR4-Puffer) entfernt. Verbliebene DNA wurde zwischen dem ersten und zweiten Waschschrift 30 min mit DNase I (20 µl; 55 U) abgebaut. Die RNA wurde mit BR5-Puffer eluiert. Die so gewonnene RNA-Fraktion repräsentiert durch die schnelle Stabilisierung recht gut das Expressionsprofil *in vivo*.

2.2.2.3 Handhabung von RNA

Ein prinzipielles Problem bei der Isolierung von mRNA besteht darin, dass sie in Form von Einzelsträngen besonders anfällig gegenüber abbauenden Enzymen (RNasen) ist. Diese Enzyme sind sehr stabil und aktiv, so dass besondere Vorsichtsmaßnahmen getroffen wurden. So wurden RNase-freie Handschuhe, Plastikpipetten und (zum Teil silikonisierte) Plastikgefäße benutzt. Glasgefäße, Küvetten, Pinzetten und Hybridisierungs-Kammern wurden mit einer „RNase away“-Lösung (6.1.1) und RNase-freiem Wasser (DEPC; 6.1.3) behandelt.

2.2.2.4 Gel-Elektrophorese

Die Integrität der isolierten RNA wurde durch eine Gel-Elektrophorese überprüft. Die Elektrophorese-Kammer wurde mit „RNase-Away“ behandelt und anschließend zweimal mit DEPC-H₂O gewaschen. Für ein TAE-Gel mit 1 % DNA-Agarose der Größe 10 x 14 x 0,7 cm wurde 1 g DNA-Agarose und 2 µl Ethidiumbromid mit 100 ml 1x TAE-Puffer (2 ml 50x TAE + 98 ml RNase-freies H₂O) erhitzt und auf den Gelträger gegossen.

Je 5 µl Probe und 1 µl 6x Lade-Puffer wurden in die Geltaschen pipettiert und die Elektrophorese 45 min bei 75 V laufen gelassen. Die Auswertung erfolgte mit einem UV-Transilluminator. Bei intakter RNA erscheinen dabei die 28S und 18S rRNA-Untereinheiten als scharf abgegrenzte Banden.

2.2.2.5 RNA-Quantifizierung

A.) Hoch-konzentrierte RNA-Lösungen können im Spektralphotometer gemessen werden. 15 µl der Probe wurde 1 : 20 mit RNase-freiem H₂O verdünnt und das Absorptions-Spektrum (300 – 200 nm) bestimmt. Die Küvetten wurden vorher mit RNase-away gereinigt und zweimal mit RNase-freiem H₂O gespült. Der Molekularkoeffizient bei A₂₅₆ entspricht 40 µg/ml RNA. Für Cy3- und Cy5-gelabelte RNA-Sonden wurde ein Absorptionsspektrum vom 690 – 200nm aufgenommen, um zusätzlich die spezifische Markierungs-Rate zu bestimmen.

B.) Geringere Mengen RNA wurden mit der sensitiveren RiboGreen RNA-Quantifizierung bestimmt. Das RiboGreen-Reagenz ist ein ultrasensitiver Fluoreszenz-Farbstoff für die Quantifizierung von RNA in wässriger Lösung. Das Exzitations-Maximum liegt bei ~500 nm und das Emissions-Maximum bei ~525 nm. Der Meßbereich ist linear für RNA-Konzentrationen von 40 ng/ml – 1 µg/ml. Die Sensitivität ist dabei 200-fach höher als bei Ethidiumbromid-Färbungen und 1000-fach höher als bei Messungen der UV-Absorption. Die Linearität wird auch bei Verunreinigungen (z.B. durch freie Nukleotide, Salze, Proteine, Ethanol, Agarose,...) beibehalten, allerdings kann die Signalintensität verändert werden. Das RiboGreen-Reagenz bindet zwar auch an DNA, allerdings erfolgt durch die DNase-Behandlung während der RNA-Isolierung eine RNA-selektive Messung. Das RiboGreen-Reagenz wird 1 : 200 mit TE verdünnt und dunkel gelagert, um eine Photodegradierung zu vermeiden. Für die Standardkurve (40 bis 1000 ng/ml) wurde isolierte rRNA aus E.coli verwendet. Auf eine 96er Microtiter-Platte wurden zwei Reihen mit je 50 µl TE, zweimal 50 µl je Konzentration des rRNA-Standards und je zweimal 50 µl der Probe (in TE verdünnt) pipettiert. Nach Inkubation (5 min; RT) mit je 50 µl RiboGreen-Reagenz im Dunkeln wurden die Proben mit einem FL 500-Microplate Fluoreszenz-Reader ausgewertet.

Der Mittelwert der TE-Blanks wurde von allen Standards und Proben abgezogen. Mit diesen korrigierten Daten wurde eine Standardkurve der Fluoreszenz gegen die RNA-Konzentration erstellt. Anhand dieser Kurve wurde die RNA-Konzentration der Proben bestimmt.

2.2.2.6 RNA- Amplifizierung

cDNA-Synthese von Total-RNA (erster Strang):

10 µg total-RNA wurden mit 2 µl Oligo[(dt)₂₀T7-promotor]-primern und RNase-freiem H₂O 10 min bei 70°C im Thermocycler inkubiert. Zu diesem RNA-Primer Mix wurden 8 µl 5x RT-Puffer, 4 µl 0,1 M DTT, 2 µl AMV Reverse-Transkriptase (25 U/µl), 1 µl RNase-Inhibitor (25 U/µL) und 4 µl dNTP-Mix (10 mM von jedem Nukleotid) hinzugegeben und dann 60 min bei 42°C inkubiert.

Synthese des zweiten Strangs:

Zu dem Mix für die Synthese des ersten Strangs wurden nun 30 µl 5x 2.Strang-Puffer, 1,5 µl dNTP (10 mM von jedem Nukleotid), 6,5 µl 2.Strang-Enzymmix und 72 µl RNase-freies H₂O hinzugegeben und 2 h bei 16°C inkubiert und danach auf Eis gestellt. Es wurden 20 µl (20 U) T4 DNA-Polymerase zugegeben und 5 min bei 16°C inkubiert, bevor die Reaktion mit 17 µl EDTA 0,2 M pH 8,0. Nun begann ein RNA- und Protein-Abbau mit 15 U RNase I und 3 U Proteinase K (je 30 min bei 37°C).

Reinigung der dsDNA-Synthese mit dem High Pure RNA Tissue Kit:

Die dsDNA wurde in Bindungs-Puffer (incl. β-Mercaptoethanol) und Ethanol (96 %) aufgenommen und auf die Spin Columns übertragen, zentrifugiert und der Durchfluß verworfen. Ebenso verfährt man mit dem Wasch-Puffer 1 und 2.

Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt wurde die Membran getrocknet und dann die dsDNA mit Elutions-Puffer eluiert. Die Proben wurden mit einem Speed-Vac-Konzentrator getrocknet und bei -70°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

T7-Transkription und Fluoreszenz-Markierung der cRNA:

Die Transkription erfolgt mit dem MEGAscript T7 Kit. Dazu wurde die dsDNA mit 3 µl RNase-freiem H₂O, 6 µl ATP-/CTP-/GTP-Mix (je 25 mM), 1,3 µl UTP (75 mM), 10x Reaktions-Puffer, 2 µl Enzym-Mix (mit RNA-Polymerasen und RNase-Inhibitoren), 5 µl Cy 3 bzw 5 -UTP (5 mM) und 5,2 µl T7-Polymerase kombiniert und 16 h bei 37°C

inkubiert. Die Proben wurden wiederum mit dem High Pure RNA Tissue Kit gereinigt (s.o.). Zusätzlich wurden die Proben 30 min mit 20 µl DNase (55 U) behandelt. Die RNA-Konzentrationsbestimmung und Überprüfung des Cy-UTP-Einbaus erfolgte am Spektralphotometer (s.o.).

Fragmentierung der markierten cRNA:

Je eine Cy 3- und Cy 5-markierte RNA-Sonde wurden zusammen mit 5x Fragmentierungs-Puffer vermischt, zentrifugiert und für 15 min bei 94°C inkubiert. Die Zugabe von 20 µg t-RNA sollte einem übermäßigen Verlust von Proben-RNA entgegenwirken. Die Proben wurden im Speed-Vac getrocknet und bei -70°C gelagert.

2.2.2.7 Hybridisierung des PAN-Arrays mit gelabelten RNA- Sonden

Hybridisierung des Arrays:

Zum Abdecken unspezifischer Bindungsstellen wurden die Arrays 45 min bei 42°C mit vorgewärmter Blocking-Lösung behandelt. Arrays wurden fünffach mit RNase-freiem H₂O gewaschen und anschließend zum Trocknen zentrifugiert (2 min, 1600 rpm).

Die Hybridisierungskammer wurde mit RNase-away gereinigt und mit RNase-freiem H₂O gewaschen. Vor dem Auftrag wurden die Proben 3 min auf 94°C erhitzt, für 30 sec auf Eis gestellt und 30 sec in einer Microfuge zentrifugiert, um das Bindungspotential zu erhöhen. Nach dem Auftragen auf den Array wurde ein 20 x 20 mm Deckglas aufgelegt und mit „Fixogum“ versiegelt. Der Array wurde in Wasser-gesättigter Atmosphäre 42 h bei 42°C inkubiert.

Das Deckgläschen wurde entfernt und dann der Array im Überkopfschüttler nacheinander jeweils 5 min mit je 30 ml Wasch-Puffer I bis III gewaschen und zum Trocknen zentrifugiert (1600 rpm, 2 min).

Array Scanning:

Die Auswertung der Arrays erfolgte mit einem Affymetix 418 Array Scanner und dem Programm BioDiscovery (Los Angeles, USA) bei der MWG-Biotech AG (Ebersberg).

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von CLL-Patienten

Die CLL-Patienten deren Blutproben im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, sind bezüglich ihrer klinischen Eigenschaften retrospektiv in zwei Gruppen unterteilt worden. Die erste Gruppe, die im weiteren Verlauf als „sensitiv“ bezeichnet wird, umfasste Patienten die bisher keine Chemotherapie erhalten hatten oder die auf eine Therapie mit Chlorambucil mit einer Reduktion der peripheren Lymphozytenzahlen auf Normalwerte reagiert hatten.

Die zweite Gruppe, im weiteren Verlauf als „resistent“ bezeichnet, enthielt Patienten, die eine alternative Chemotherapie mit Fludarabin erhielten, da ihre Tumorzellen auf eine Behandlung mit Chlorambucil nicht mehr ansprachen. Auch multiresistente CLL-Patienten, die weder auf Chlorambucil- noch Fludarabin-Therapie ansprachen, wurden dieser Gruppe zugeordnet.

Dabei wurden Fälle mit primärer Resistenz ausgeschlossen und nur Fälle berücksichtigt in denen die Chemotherapie-Resistenz im Laufe mehrerer Behandlungszyklen erworben wurde.

3.1.1 Isolierung von CD19⁺-Lymphozyten

Nur ca. 4 % der insgesamt etwa 2×10^{12} Lymphozyten die ein Mensch normalerweise besitzt befinden sich im Blut. Davon sind ca. 70-80 % T-Lymphozyten. Bei CLL-Patienten führt die Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark neben einer Anämie, Thrombozytämie und Neutropenie auch zu einer Abnahme des Anteils an T-Lymphozyten (Rummel, 1998). Zur Bestimmung des Anteils an T- bzw. B-Zellen wurden die Lymphozyten einzelner Spender mit CD19-Antikörpern markiert und durchflusszytometrisch bestimmt. Während der Anteil bei gesunden Spendern an B-Lymphozyten (CD19⁺) erwartungsgemäß gering war (5-12 %), lag der Anteil bei CLL-Patienten bei über 90 % (Abb. 5).

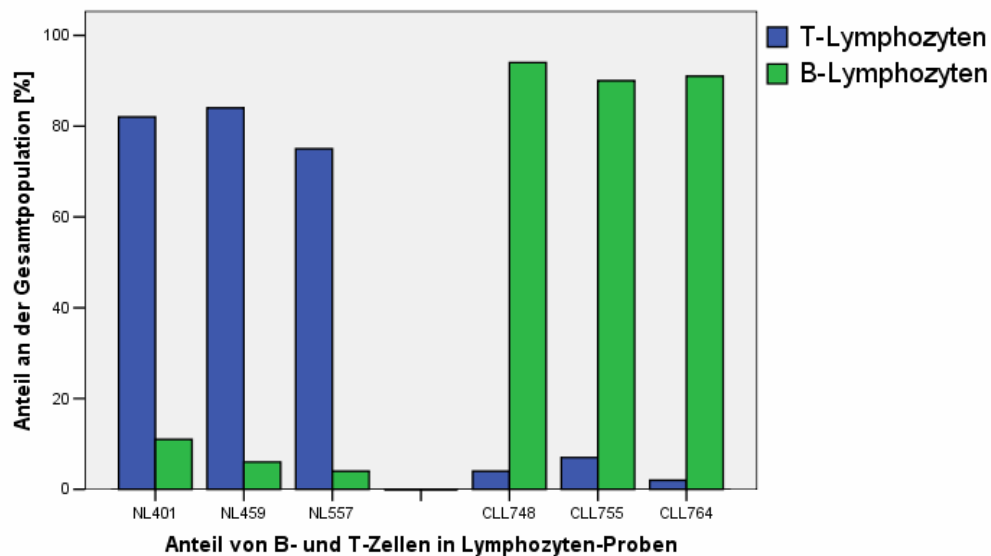


Abb. 05: Anteil von B- und T-Lymphozyten in Blutproben von normalen Probanden und von CLL-Patienten. Mittels Dichte-Gradienten-Zentrifugation wurden von jeweils drei Blutproben von normalen Spendern (NL 401 / 459 / 557) und von CLL-Patienten (CLL 748 / 755 / 764) die Lymphozyten isoliert. Nach Inkubation mit Magnetobead-gekoppelten anti-(CD19)-Antikörpern wurden im magnetischen Feld die CD19⁺-Zellen isoliert und anschließend mit Fluorochrom-Antikörpern markiert. Die Auswertung erfolgte mittels FACS.

Um die Proben von gesunden Spendern und von CLL-Patienten in funktionellen Assays bei der Bestimmung von RNA-Expressionsprofilen (Microarrays) vergleichen zu können, wurden für die folgenden Experimente nur die isolierten CD19⁺-Zellen verwendet. Die Reinheit der sortierten Zell-Fraktion wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt und lag in allen Fällen bei 80-95 %.

3.2 Toxizität DNA-schädigender Substanzen bei normalen und bei CLL-Lymphozyten

3.2.1 Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen nach Zytostatika-Behandlung *ex vivo*

Das Ziel der Chemotherapie mit DNA-reaktiven Substanzen ist es, in den Tumorzellen ein so großes Ausmaß an DNA-Schädigung zu erzeugen, dass die Apoptose eingeleitet wird oder die Zellen über andere Mechanismen absterben (Herzog et al., 1998; Hirao et al., 2000; Rich et al., 2000).

Isolierte B-Lymphozyten von gesunden Spendern und von CLL-Patienten wurden *ex vivo* mit verschiedenen DNA-schädigenden Substanzen behandelt, um die Sensitivität der Zellen gegenüber Chemotherapeutika anhand der Apoptose-Rate zu bestimmen. Dies war notwendig, um später die Sensitivität von normalen und von CLL-Lymphozyten zu vergleichen und Analogien zwischen zellulärer DNA-Reparaturkapazität und Überlebensrate beurteilen zu können.

Außerdem ist es für die folgenden Untersuchungen der DNA-Reparatur wichtig, dass in den Zellen zwar Addukte gebildet werden, der genomische Schaden aber nicht so groß ist, dass die Apoptose eingeleitet wird. Unter diesen Umständen würde sich sehr wahrscheinlich das Genexpressionsmuster der Zellen verändern, so dass keine Aussage über die Expression einzelner DNA-Reparaturgene oder eine funktionelle Messung der DNA-Reparaturkapazität möglich wäre.

DNA-Adduktbildung durch Zytostatika:

Zu den bei diesen Untersuchungen eingesetzten Substanzen gehören N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff (EtNU), Melphalan und Cisplatin (Abb. 6). Im Gegensatz zu vielen der im klinischen Einsatz befindlichen Chemotherapeutika, ist die Qualität und Quantität der DNA-Schäden bei diesen Substanzen gut untersucht.

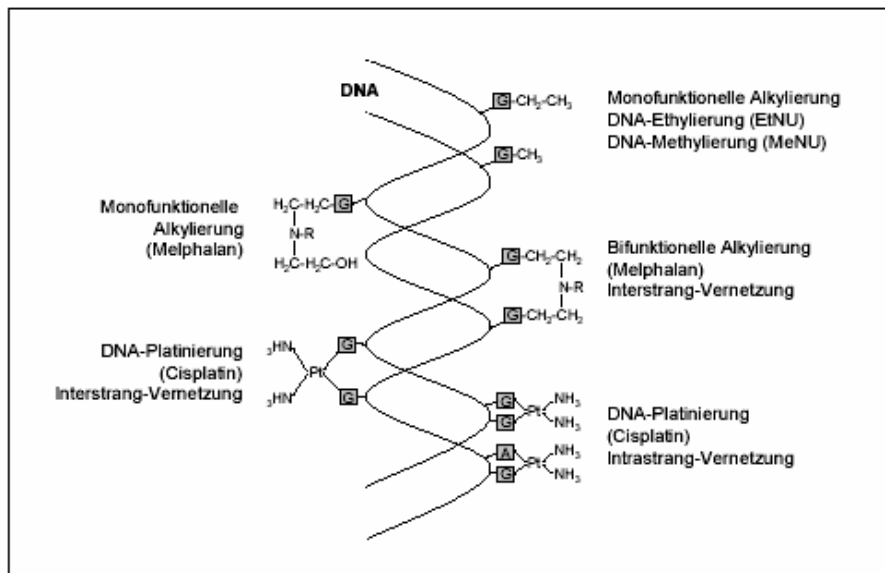


Abb. 06: Schematische Darstellung der durch alkylierende Substanzen (Melphalan, EtNU, MeNU) und Cisplatin ausgebildeten DNA-Addukte.

■ N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff (EtNU) dient als Standard-Agens zur DNA-Alkylierung. Es zerfällt unter physiologischen Bedingungen heterolytisch sehr rasch ($t_{1/2}$: 9 Minuten, bei 37°C, pH 7,25) in elektrophile Karb-Anionen (Goth & Rajewsky, 1972). Nach einer Expositionszeit von 20 Minuten sind demnach etwa 80 % der möglichen Karb-Anionen entstanden und haben mit nukleophilen Zentren der DNA weiter reagiert. Daher wurden die untersuchten Zellen bereits nach 20 Minuten Expositionszeit wieder in ein normales Medium überführt.

Der relative Anteil der dabei entstehenden DNA-Alkylierungsprodukte und deren Struktur ist gut untersucht (Beranek, 1990): Das Hauptprodukt stellen mit ca. 55 % die chemisch und biologisch weitgehend stabilen Ethyl-Phosphotriester dar. Die Alkylierung an den N- und O-Atomen der Basen erfolgt mit geringerer Häufigkeit. So werden ca. 11 % N7-Ethylguanin, ca. 8 % O⁶-Ethylguanin, ca. 7.5 % O²-Ethylthymine und ca. 4 % N3-Ethyladenine gebildet. Die durch das breite Schadensspektrum gebildeten DNA-Addukte sind Substrate für verschiedene DNA-Reparaturwege (Buschfort et al., 1997), so dass EtNU sich besonders gut zur Untersuchung der Gesamt-Reparaturleistung einer Zelle eignet. Obwohl EtNU nicht in der Tumorthherapie eingesetzt wird, stellt es für *in vitro* Analysen, wegen seiner schnellen Reaktionskinetik eine gute Standardsubstanz aus der Gruppe der Alkylantien da.

■ Melphalan ist ein bifunktionelles Alkylant, das in der Tumorthherapie vor allem beim multiplen Myelom und bei Ovarialkarzinomen eingesetzt wird (Samuels & Bitran, 1995; Sirohi & Powles, 2004). Es besteht eine sehr hohe Korrelation zwischen einer Sensitivität gegenüber Melphalan und dem in der klinischen CLL-Therapie zumeist initial eingesetzten Chlorambucil (Bramson et al., 1995).

Die Alkylierung erfolgt hauptsächlich am N7 des Guanins. An dieser Stelle entstehen neben G-Monoaddukten auch GG-Quervernetzungen (Zeller, 1995). Auf diesen Interstrang-DNA-Quervernetzungen beruht die Haupttoxizität, da sie die Transkription und Replikation der DNA behindern (Spanswick et al., 2002). Die in der Klinik oft dosislimitierende Knochenmark-Toxizität (Zweegman & Huijens, 2002), spielt aufgrund der selektierten CD19⁺-Zellen bei den durchgeführten Untersuchungen keine Rolle.

■ Cisplatin (cis-Diamminodichloridoplatin [II]; DDP) ist eine anorganische Platinverbindung, die bevorzugt an das N7 von Guanin oder Adenin bindet. Dabei reagieren die zwei reaktiven Chlor-Liganden des Cisplatins mit zwei DNA-Basen, so

dass Intrastrang-DNA-Quervernetzungen (zu 50-65 % zwischen benachbarten Guanin-Molekülen, zu 25-30 % zwischen benachbarten Adenin- und Guanin-Molekülen) und Interstrang-DNA-Quervernetzungen (zu etwa 1 %) entstehen. Abgesehen davon werden noch DNA-Monoaddukte und DNA-Protein-Verknüpfungen (zu etwa 10 %) gebildet (Sanderson et al., 1996; Zeller, 1995).

Das Einsatzgebiet von Cisplatin umfasst vor allem Hoden-, Ovarial- und Bronchial-Karzinome (Eberhardt et al., 1998; Havemann & Wolf, 1997; Higby et al., 1974).

Da weder Cisplatin noch Melphalan einer intrazellulären enzymatischen Aktivierung bedürfen, eignen sich diese Substanzen besonders gut für die *in vitro* Exposition.

Apoptotische Zellen können durch spezifische Antikörper sichtbar gemacht werden:

Der hier verwendete Test beruht auf dem Abbau der Histone in apoptotischen Zellen. Dadurch wird die DNA aufgrund ihrer erniedrigten Temperatur-Stabilität bei Inkubation mit Formamid bei 75°C denaturiert, während die DNA vitaler Zellen intakt bleibt. Ein anti-[Deoxycytidin]-Antikörper (MAK F 7-26) kann dann spezifisch an ssDNA des kondensierten Chromatin apoptotischer Zellen mit mindestens 25-30 Basenpaaren binden und mit einem Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper sichtbar gemacht werden. Nekrotische und mitotische Zellen oder vollständig doppelsträngige DNA reagieren hingegen nicht mit dem Antikörper (Frankfurt & Krishan, 2001).

Mit Hilfe des Mehrparameter-Bildanalysesystems ACAS II konnte das Fluoreszenz-Signal quantitativ ausgewertet werden. Dabei integrierte das Programm die Fluoreszenz-Signale auf Einzellzebene mit automatischer Subtraktion der Hintergrund-Fluoreszenz (Abb. 7).

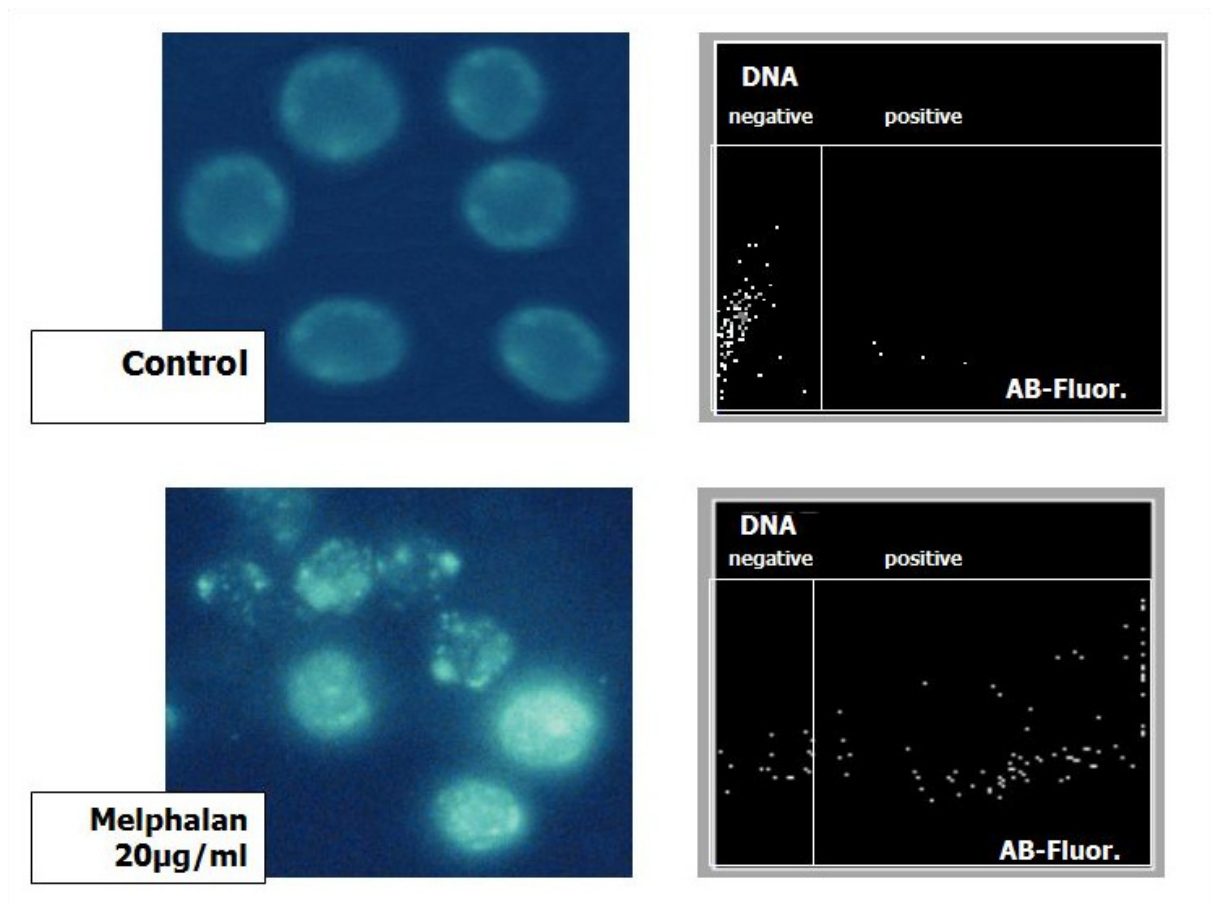


Abb. 07: **Apoptose-Induktion in humanen Lymphozyten durch Melphalan.** Die Zellsuspension der isolierten CD19⁺-Lymphozyten wurde nur in RPMI 1640-Medium (Kontrolle) oder mit 20 µg/ml Melphalan für 2 h inkubiert und danach bei -20°C in Ethanol fixiert. Nachdem die Lymphozyten in Formamid resuspendiert wurden, erfolgte die Inkubation mit dem F 7-26 Antikörper. Mit dem Zweitantikörpers ALEXA 488 erfolgte die Fluoreszenzmarkierung, die anschließende Messung wurde mit dem Fluoreszenz-Photomikroskop (Zeiss Axioplan) durchgeführt und die Ergebnisse mit Hilfe eines Bildanalyse-Programms (ACAS) ausgewertet. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ist die Fluoreszenz-Intensität in apoptotischen Zellen nach Melphalan signifikant höher ($p < 0.005$).

3.2.2 Apoptose-Induktion nach EtNU-Behandlung

B-Lymphozyten gesunder Spender wurden in Kultur mit unterschiedlichen EtNU-Konzentrationen behandelt (Expositionszeit: 20 Minuten) und 24 Stunden später wurde der Anteil apoptotischer Zellen bestimmt (s.o.). Die Zellen zeigten eine tendenziell Dosis-abhängige Zunahme der Apoptoseraten, die aber auch bei der sehr hohen Konzentration von 500 µg/ml die 25 %-Marke nicht überschritten (Abb. 8).

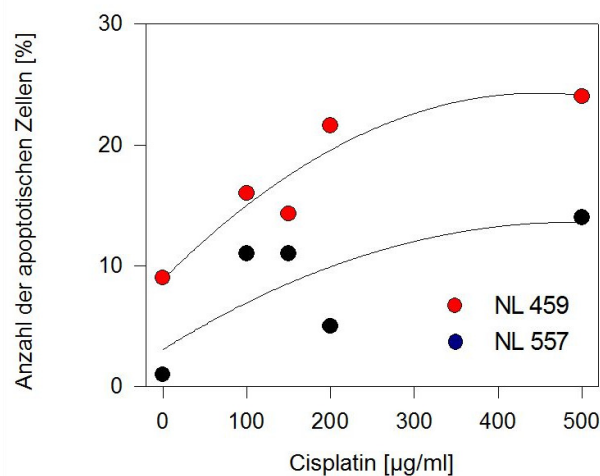


Abb. 08: Anteil apoptotischer Zellen bei normalen Lymphozyten nach EtNU-Exposition. Proben isolierter normaler Lymphozyten verschiedener Spender wurden für 20 min gegenüber unterschiedlichen Konzentrationen von EtNU exponiert. Die Fluoreszenz-Signale auf Einzelzell-Ebene (siehe Abb. 07) wurden mit automatischer Subtraktion der Hintergrund-Fluoreszenz von jeweils mindestens 100 Zellen analysiert.

Dies mag daran liegen, dass bei einem Teil der Zellen die Apoptose erst zu einem späteren Zeitpunkt eintritt und so von dem Test nicht mehr erfasst wird.

Allerdings gibt es wenige Alternativen zu dieser Methode, da andere Untersuchungen wie z.B. die Messung der Stoffwechselaktivität beim *in vitro* MTT-Test keine zuverlässigen Werte angibt, da nach der notwendigen langen Inkubationszeit von drei bis fünf Tagen viele Zellen auch ohne DNA-reaktive Substanzen stark geschädigt sind.

3.2.3 Apoptose nach Melphalan-Behandlung

Bei der Apoptose-Induktion durch Melphalan in normalen B-Lymphozyten kommt es nach 24 Stunden Inkubation zu einem Dosis-abhängigen biphasischen Verlauf mit steilem Anstieg in einem Konzentrationsbereich bis 20 µg/ml und einer nachfolgenden Plateau-Phase mit nur geringer Steigerung der Anzahl apoptotischer Zellen. Zusätzlich treten vor allem in hohen Dosisbereichen starke individuelle Unterschiede auf (Abb. 9a). Neben der Melphalan-Dosis spielt auch die Inkubationszeit eine Rolle bei der Apoptose-Induktion (Abb. 9b). Während der biphasische Verlauf erhalten bleibt, ändert sich sowohl die Anstiegsteilheit als auch das erreichte Plateau. So sind nach 24 Stunden Inkubationszeit über 90 % der Zellen apoptotisch, während nach 5 Stunden Inkubationszeit nur 69 % der Zellen apoptotisch sind.

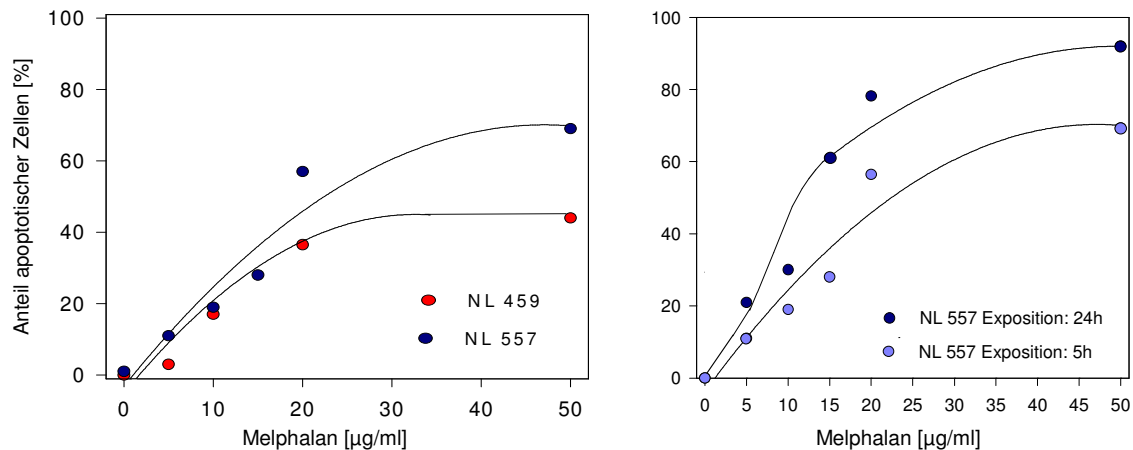


Abb. 09: Anteil apoptotischer Zellen bei normalen Lymphozyten nach Melphalan-Exposition. **A.)** Proben isolierter normaler Lymphozyten verschiedener Spender wurden für 2 h gegenüber unterschiedlichen Konzentrationen von Melphalan exponiert. **B.)** Proben isolierter normaler Lymphozyten eines Spenders wurden für 5 h bzw. 24 h gegenüber verschiedenen Konzentrationen von Melphalan exponiert. Die Fluoreszenz-Signale auf Einzelzell-Ebene (siehe Abb. 07) wurden mit automatischer Subtraktion der Hintergrund-Fluoreszenz von jeweils mindestens 100 Zellen analysiert.

Im Vergleich zu den normalen Lymphozyten weisen CLL-Lymphozyten Therapie-sensitiver Probanden (Abb. 10) einen wesentlich höheren Anteil apoptotischer Zellen auf. Schon bei 20 $\mu\text{g/ml}$ Melphalan wird ein Plateau von 76 – 82 % erreicht, während es bei normalen Lymphozyten nur 36-57 % waren. Dies zeigt die vergleichsweise hohe Empfindlichkeit von CLL-Lymphozyten gegenüber DNA-reaktiven Substanzen zum Beginn der medikamentösen Behandlung. Erst im Verlauf der Erkrankung findet unter dem Selektionsdruck der Chemotherapeutika eine langsame Resistenzentwicklung statt.

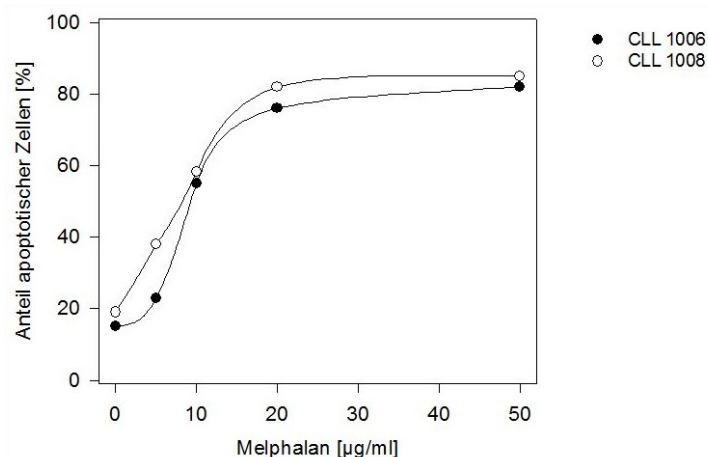


Abb. 10: Anteil apoptotischer Zellen bei CLL-Lymphozyten nach Melphalan-Exposition. Proben isolierter CLL-Lymphozyten verschiedener Spender wurden für 2 h gegenüber unterschiedlichen Konzentrationen von Melphalan exponiert. Die Fluoreszenz-Signale auf Einzelzell-Ebene (siehe Abb. 07) wurden mit automatischer Subtraktion der Hintergrund-Fluoreszenz von jeweils mindestens 100 Zellen analysiert.

3.2.4 Anzahl der apoptotischen Zellen nach Cisplatin-Behandlung

Unter Exposition mit Cisplatin zeigen Lymphozyten normaler Spender eine annähernd lineare Zunahme der Fraktion apoptotischer Zellen mit der Konzentration. Bei hohen Konzentrationen von 100 µg/ml sind 42 – 56 % der Lymphozyten apoptotisch (Abb. 11).

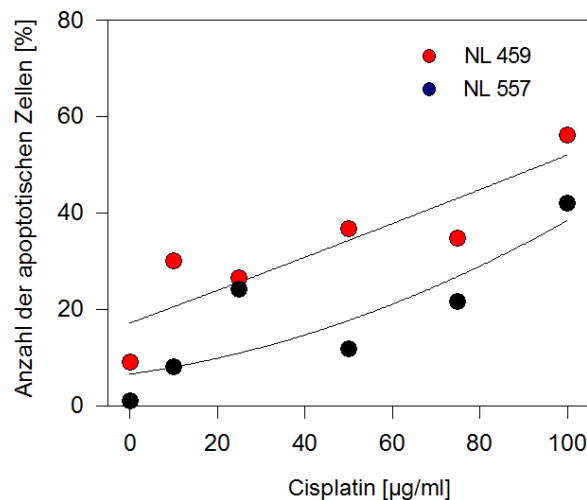


Abb. 11: Anteil apoptotischer Zellen bei normalen Lymphozyten nach Cisplatin-Exposition. Normale Lymphozyten unterschiedlicher Spender wurden für 2 h mit verschiedenen Konzentrationen von Cisplatin inkubiert. Die Fluoreszenz-Signale auf Einzelzell-Ebene (siehe Abb. 07) wurden mit automatischer Subtraktion der Hintergrund-Fluoreszenz von jeweils mindestens 100 Zellen analysiert.

3.2.5 Anzahl der apoptotischen Zellen ist abhängig vom Reparatur-Phänotyp

Die DNA-schädigenden Substanzen induzieren eine Vielzahl unterschiedlicher DNA-Addukte, die parallel über verschiedene Reparaturwege beseitigt werden können. Die starken individuellen Unterschiede in der Reparaturkapazität ergeben sich durch verschiedene Reparatur-Phänotypen (schnell, mittel, langsam) in normalen Lymphozyten.

Dieses legt nahe, dass Zellen mit hoher Reparaturkapazität in der Lage sind, im gleichen Zeitraum mehr DNA-Addukte zu eliminieren und so die Induktion der Apoptose effektiver zu verhindern.

3.3 Nachweis der Bildung und des Wiederverschlusses von Reparatur-induzierten DNA-Strangbrüchen

Zur Untersuchung der funktionellen Reparaturkapazität von B-Lymphozyten nach *in vitro* Exposition mit DNA-schädigenden Substanzen wurden die Zellen mit Hilfe der Einzelzell-Gelelektrophorese („Comet Assay“) untersucht (Singh et al., 1988; Tice et al., 2000). Mit diesem Verfahren ist es möglich, Strangbrüche in der nukleären DNA individueller Zellen nachzuweisen. Diese entstehen zum Teil spontan, wie z.B. an destabilisierten abasischen Stellen (Lindahl, 1993), aber größtenteils intermediär während zellulärer DNA-Reparaturprozesse (Krokan et al., 1997) (Abb. 12).

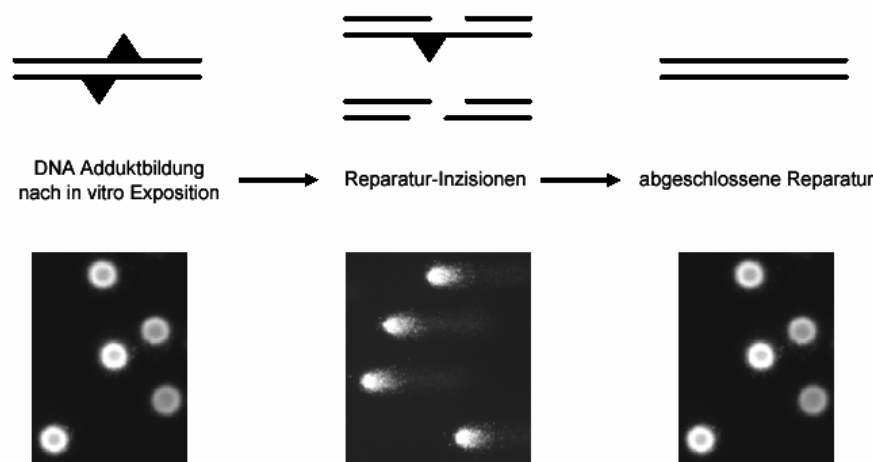


Abb. 12: Nachweis von Reparatur-induzierten Strangbrüchen im „Comet Assay“ (alkalische Einzelzell-Gelelektrophorese). **A.)** Nach *in vitro*-Exposition z.B. gegen Melphalan wird eine Reihe unterschiedlicher DNA-Addukte gebildet, die durch Inzisionen unterschiedlicher Enzyme der verschiedenen DNA-Reparatursysteme entfernt werden können. Die durch die Reparatur entstehenden Lücken werden durch DNA-Ligasen anschließend verschlossen. **B.)** Im „Comet Assay“ werden durch DNA-Reparatur induzierte Einzel- und Doppelstrangbrüche durch die elektrophoretische Mobilität der DNA-Fragmente sichtbar (Flächenvergrößerung). Nach abgeschlossener Reparatur ist die intakte DNA wiederhergestellt (Normalisierung der Fläche). (Modifiziert nach R. Deenen (IFZ)).

Nach Einbettung der Zellen in eine Gelmatrix werden sie *in situ* lysiert, die Kern-DNA alkalisch denaturiert und die durch Einzelstrangbrüche entstandenen DNA-Fragmente in Abhängigkeit ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt. Als Maß für die relative Zahl der Strangbrüche dient, nach Anfärbung der DNA mit Ethidiumbromid, die Fläche des entstandenen „Kometen“ und deren Fluoreszenz-Intensität. Diese kann im Kern einzelner Zellen mit speziellen Image-Analyse-Programmen im Fluoreszenzmikroskop quantitativ bestimmt werden.

Dabei spiegelt der „Comet Assay“ einen dynamischen Prozess wider, bestehend aus mehreren parallel und nacheinander ablaufenden Reaktionen. Limitierend für die Menge der DNA-Intermediate im Zellkern sind die Initialreaktionen (Inzision oder Exzision der induzierten Primäraddukte) und die finalen Reaktion (Auffüllungssynthese und Ligation). Für das Maß der Reparaturgeschwindigkeit wurde neben der initialen relativen Flächenvergrößerung (t_0) die Zeit berechnet, die von den Zellen benötigt wurde, um 50 % bzw. 90 % der initialen Strangbrüche zu prozessieren (t_{50} bzw. t_{90}).

Die Auswertung und die statistische Analyse relativ großer Zellzahlen (> 100 Zellen pro Zeitpunkt) verhindert, dass die Mittelwerte durch Zell-zu-Zell Unterschiede zu stark beeinflusst werden. Dabei zeigte sich eine relativ kleine interzelluläre Varianz (Variationskoeffizient 7,4-18,2 %) und eine gute Reproduzierbarkeit.

3.3.1 Prozessierung Schadstoff-induzierter DNA-Strangbrüche bei normalen Lymphozyten nach EtNU-Behandlung

Zur Messung der Gesamtreparaturleistung einer Zellpopulation wurden die Reparaturkinetiken aufgezeichnet. Um später die Unterschiede in der Resistenz-Entwicklung von CLL-Lymphozyten aufzeigen zu können, wurde zunächst eine Vergleichspopulation von normalen B-Lymphozyten (NL) ausgewertet.

Aufgrund der schnellen Reaktionskinetik sind bei einer Dosis von 100 µg EtNU/ml nach 20 Minuten Inkubationszeit bereits fast alle DNA-Addukte in Reparatur-induzierte Einzelstrangbrüche überführt worden. Zu Beginn der Messung (t_0) war daher die größte Anzahl an DNA-Strangbrüchen anhand der relativen Flächenvergrößerung messbar. Dieser Wert gilt als erster wichtiger Parameter für die Beurteilung der DNA-Reparatureffizienz. Auch hier waren große individuelle Unterschiede zwischen den Zellen verschiedener Probanden sichtbar. Diese Unterschiede beruhen auf der unterschiedlich effizienten Schadens-Prozessierung, da die Zerfallskinetik von EtNU und die primär gebildeten DNA-Addukte bei allen Proben gleich sind (Abb. 13).

Die sehr niedrige relative Flächenvergrößerung bei NL 557 lässt darauf schließen, dass hier die Induktion und Reparatur der DNA-Strangbrüche zu großen Teilen schon während der Expositionszeit stattgefunden hat, so dass nur noch ein kleiner Anteil an DNA-Strangbrüchen zum Zeitpunkt der ersten Messung vorlag. Dies deutet auf einen Phänotyp sehr schneller Reparatur-Prozessierung hin.

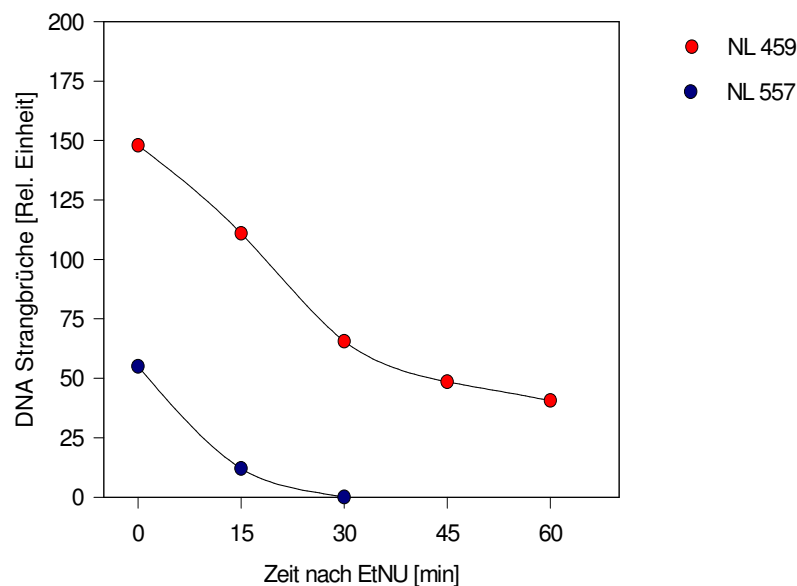


Abb. 13: Kinetiken der Prozessierung von DNA-Strangbrüchen bei normalen Lymphozyten nach EtNU-Exposition. Normale Lymphozyten unterschiedlicher Spender wurden *in vitro* mit EtNU (100 µg/ml, 20 min, 37°C) inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Zell-Aliquots entnommen und mit Hilfe des „Comet Assays“ auf DNA-Strangbrüche untersucht. Zur Bewertung der Reparatureffizienz der verschiedenen Proben wurde die Zeit bestimmt, die für die Reparatur von 50 % bzw. 90 % der initialen Strangbrüche benötigt wurde ($t_{50\%}$ bzw. $t_{90\%}$).

3.3.2 Prozessierung Schadstoff-induzierter DNA-Strangbrüche bei CLL-Lymphozyten nach EtNU-Behandlung

Im Gegensatz zu NL war bei der Untersuchung von CLL-Lymphozyten eine Konzentration von 150 µg EtNU/ml für 20 Minuten notwendig, um eine ausreichende Kometen-Größe für die Messung zu erreichen. Diese erniedrigte Strangbruchrate kann sowohl durch eine verringerte Inzisions-Aktivität, als auch durch eine Beschleunigung der späteren Schritte der DNA-Reparatur bei den Tumorzellen zustande kommen.

Insgesamt wurden Zellproben von 21 CLL-Patienten analysiert (Tab. 1). Auch hier ist ein breites Spektrum zellulärer Reparatur-Kinetiken für die Strangbruchprozessierung von CLL-Lymphozyten nachweisbar (Abb. 14). Die mittlere „initiale“ Kometen-Größe (t_0) variierte dabei für die einzelnen Proben zwischen 26 % und 434 %, die Halbwertszeiten ($t_{50\%}$) lagen zwischen 6 und 60 Minuten. Eine Ausnahme stellt in dieser Hinsicht nur die Probe CLL 1004 dar, bei der eine außergewöhnlich lange Halbwertszeit von 90 Minuten gemessen wurde. Unabhängig von den Unterschieden der Reparatur-Kinetik im Vergleich zu normalen Lymphozyten, lassen sich auch die CLL-Lymphozyten innerhalb ihrer Gruppe in „langsame“, „mittlere“ und „schnelle“ Reparatur-Phänotypen unterteilen.

In der Gruppe „schnell“ (z.B. CLL 930) zeigt sich neben kleinen „initialen“ Kometen eine sehr schnelle Prozessierung der DNA-Reparatur-Intermediate innerhalb von 15 Minuten. In Abhängigkeit von der „initialen“ Kometen-Bildung und der Reparaturzeit können noch die zwei Untergruppen der „Mittleren“ (z.B. CLL 529) und der „Langsamen“ (z.B. CLL 1006) differenziert werden. Dabei sind die Unterschiede des Reparatur-Phänotyps auf die DNA-Reparaturkapazität deutlich sichtbar (Abb. 15).

Probe	t 0 [%]	t 50% [min]	t 90% [min]	Phänotyp
CLL 417	346	25	90	langsam
CLL 425	117	35	55	mittel
CLL 529	106	40	70	mittel
CLL 543	259	48	70	langsam
CLL 544	434	34	70	langsam
CLL 594	106	35	55	mittel
CLL 606	190	10	60	mittel
CLL 609	274	30	60	langsam
CLL 610	368	12	40	mittel
CLL 612	26	12	35	schnell
CLL 632	315	37	55	langsam
CLL 767	44	12	22	schnell
CLL 929	5	15	25	schnell
CLL 930	62	6	15	schnell
CLL 936	229	46	60	langsam
CLL 940	81	12	31	schnell
CLL 942	389	54	90	langsam
CLL 1004	260	90	120	langsam
CLL 1005	235	60	90	langsam
CLL 1006	281	35	90	langsam
CLL 1008	192	45	75	langsam

Tab. 01: Klassifizierung der DNA-Reparaturkapazität von CLL-Lymphozyten nach EtNU-Exposition. Die Messung erfolgte mittels „Comet Assay“. t0 = initiale Kometenbildung [%] im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe; t50% = Minuten bis zur Reduktion der Kometenfläche um 50%; t90% = Minuten bis zur Reduktion der Kometenfläche um 90%.

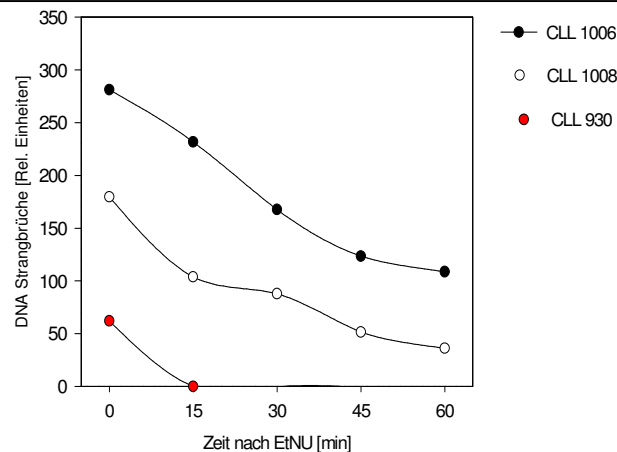


Abb. 14: Kinetiken der Prozessierung von DNA-Strangbrüchen bei CLL-Lymphozyten nach EtNU-Exposition. CLL-Lymphozyten unterschiedlicher Spender wurden *in vitro* mit EtNU (150 µg/ml, 20 min, 37°C) inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Zell-Aliquots entnommen und mit Hilfe des „Comet Assays“ auf DNA-Strangbrüche untersucht. Zur Bewertung der Reparatureffizienz der verschiedenen Proben wurde die Zeit bestimmt, die für die Reparatur von 50 % bzw. 90 % der initialen Strangbrüche benötigt wurde (t50% bzw. t90%).

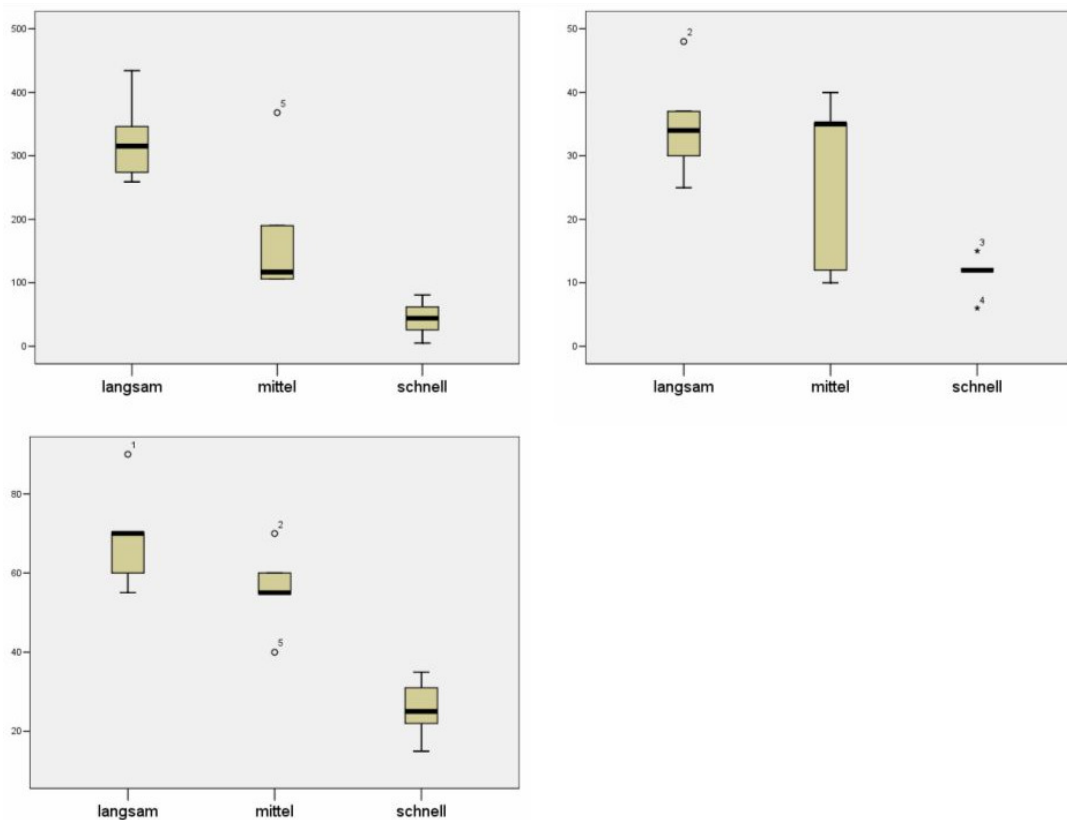


Abb. 15: Einfluss verschiedener Reparatur-Phänotypen auf die initiale Fläche sowie die Reparaturzeiten im „Comet Assay“. A.) initiale Fläche der Kernfluoreszenz (%) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe des „Comet Assay“ von CLL-Lymphozyten nach Inkubation mit EtNU (150 µg/ml, 20 min, 37°C) *in vitro* in Abhängigkeit vom Reparaturphänotyp (langsam / mittel / schnell). B.) Verteilung der t50% Werte (min) bzw. C.) der t90% Werte (min) in Abhängigkeit vom Reparatur-Phänotyp; Box: 25-75% Quartile, Whisker: Spannweite, Linie innerhalb der Box: Median.

3.3.3 Die Prozessierung Schadstoff-induzierter DNA-Strangbrüche ist pharmakologisch modulierbar

Die hier eingesetzte Methode des „Comet Assay“ zeigt zwar die Kinetik der Schadensprozessierung der DNA auf, allerdings gibt sie keine Auskunft über den Anteil der einzelnen dafür benutzten Reparaturwege. Vor allem im Hinblick auf die große individuelle Varianz der Reparatur-Kinetiken wäre eine Zuordnung zu einzelnen Reparaturwegen wünschenswert.

Methoxyamin (MX) ist ein Methylether, der eine spezifische Inhibition der Basen-Exzisions-Reparatur (BER) bewirkt (Liu & Gerson, 2004). Nach dem Herausschneiden einer modifizierten (z.B. ethylierten oder oxidierten) Base durch eine Reparatur-Glykosylase, bindet MX durch eine Reaktion mit der offenen Ringstruktur der Desoxyribose an die entstehende abasische Stelle und blockiert dadurch die nachfolgende Inzision des betroffenen DNA-Strangs durch eine AP-Endonuklease. Durch diese Blockade wird die gesamte weitere Prozessierung des Schadens unterbunden und so die Induktion von DNA-Strangbrüchen entsprechend des relativen Anteils des BER-Weges vermindert (Buschfort et al., 1997; Thomale et al., 1998).

Eine Inkubation mit MX vor der Behandlung mit EtNU führte in den untersuchten CLL-Lymphozyten zu einer Reduktion der „initialen“ Kometen-Fläche im Vergleich zu EtNU alleine. Der relative Anteil der verbleibenden Kometen-Fläche zeigte extreme Unterschiede zwischen einzelnen Zellproben (Tab. 2). Dies deutet darauf hin, dass die Effizienz der BER an der Gesamtreparaturleistung bei CLL-Lymphozyten eine große individuelle Spannbreite aufweist (4-100 %). Bei Proben mit einer starken Abnahme der Fläche durch MX-Vorbehandlung (z.B. CLL 612 / 940) kann daraus geschlossen werden, dass hier die DNA-Alkylierungsschäden fast ausschließlich über den BER-Weg prozessiert werden. Andere Zellproben (z.B. CLL 594 / 1008) zeigten nur eine vergleichsweise geringe BER-Aktivität und prozessieren die DNA-Addukte demnach überwiegend durch die Inzisions-Mechanismen des NER- oder des MMR-Weges (Tab. 2; Abb. 16). Zwischen diesen Extremsituationen zeigten sich bei den 21 CLL-Proben nahezu alle Übergangszustände. Dies zeigt, dass nicht nur die Gesamtleistung der Reparatur sehr unterschiedlich ist, sondern auch die relative Aktivität einzelner DNA-Reparaturwege starken Einfluss auf den Reparatur-Phänotyp hat. So ist der Anteil der BER bei Proben mit „schneller“ Reparatur überwiegend hoch, während bei den „Langsamen“ und „Mittleren“ der Anteil meist geringer ist.

Die wiederholte Analyse von Zellen gleicher Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten (z.B. CLL 417 + 610) zeigte eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Messergebnisse. Dies gilt neben der „initialen“ Kometen-Fläche auch für die prozentuale Reduktion dieser Fläche durch MX (Abb. 17). Dies deutet darauf hin, dass (solange keine Resistenzentwicklung stattgefunden hat) sowohl die gesamte DNA-Reparaturleistung der Tumorzellen als auch der relative Anteil einzelner Reparaturwege weitgehend konstant bleibt.

Probe	t 0 [%]	t0 + MX [%]	Abnahme der rel. Fläche [%]
CLL 417	346	225	35
CLL 425	117	106	10
CLL 529	106	101	5
CLL 543	259	167	36
CLL 544	434	308	30
CLL 594	106	101	5
CLL 606	190	175	8
CLL 609	274	122	55
CLL 610	368	211	43
CLL 612	26	0	100
CLL 632	315	100	69
CLL 767	44	12	73
CLL 929	5	4	20
CLL 930	62	4	94
CLL 936	229	91	60
CLL 940	81	0	100
CLL 942	389	136	65
CLL 1004	260	160	38
CLL 1005	235	202	14
CLL 1006	281	191	32
CLL 1008	192	185	4

Tab. 02: **Effekt von Methoxyamin auf die DNA-Strangbruchinduktion bei CLL-Lymphozyten nach EtNU-Exposition.** Initiale Kometenbildung [%] im „Comet Assay“ entweder ohne oder mit MX (5 mM) im Kulturmedium inkubiert.

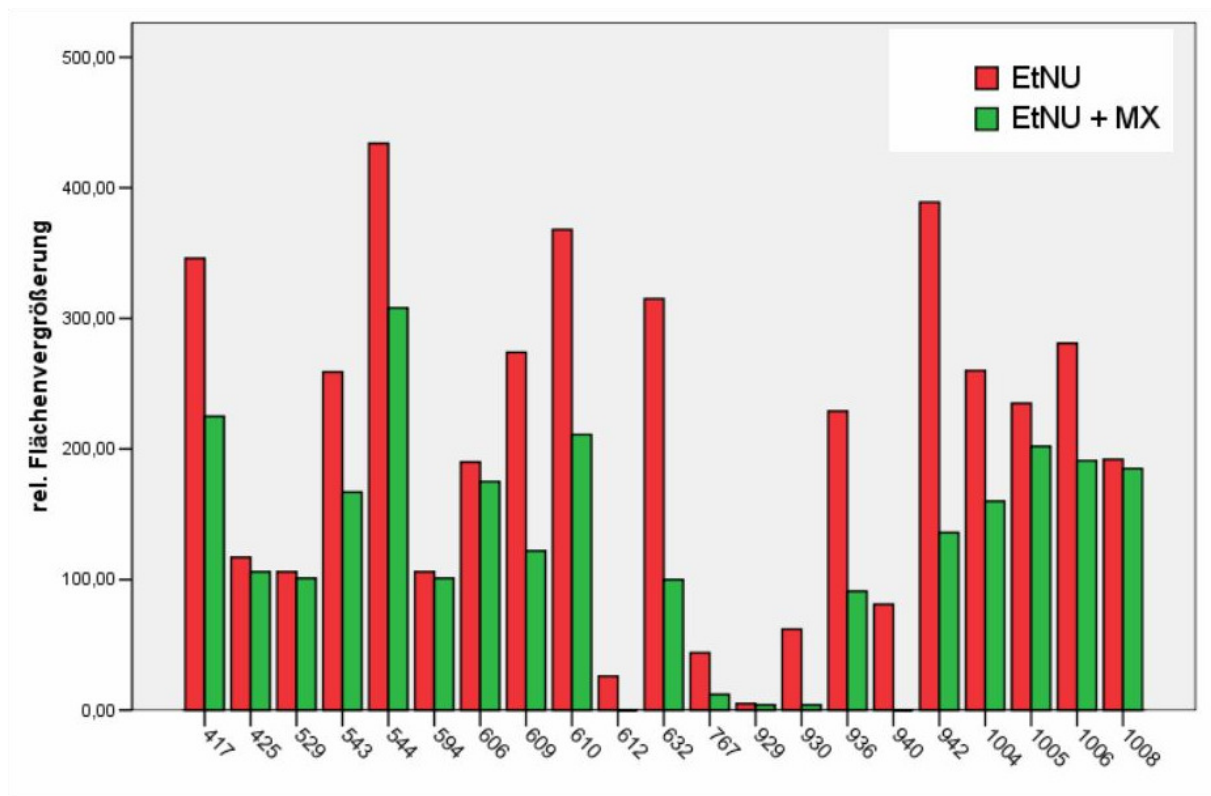


Abb. 16: Einfluss von Methoxyamin (MX) auf die Induktion von DNA-Strangbrüchen bei EtNU-exponierten CLL-Lymphozyten. DNA-Strangbrüche wurden mit Hilfe des „Comet Assay“ bei isolierten CLL-Lymphozyten nach einer Exposition gegenüber EtNU (150 µg/ml, 20 min, 37°C) *in vitro* bestimmt. Es handelt sich dabei um unbehandelte (rote Balken) oder um mit MX (1 mM, 1h) vorinkubierte Proben (grüne Balken).

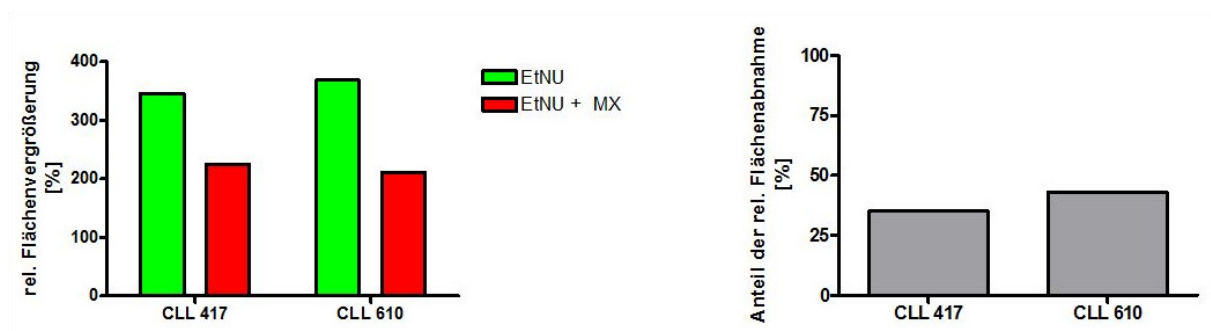


Abb. 17: Anteil der BER an der Gesamt-Reparaturleistung im Krankheitsverlauf eines Patienten. **A.)** Zu verschiedenen Zeiten des Krankheitsverlaufs eines Patienten wurden die CLL-Lymphozyten *ex vivo* mit oder ohne vorherige Inkubation mit MX mit EtNU (150 µg/ml, 20 min, 37°C) behandelt und die DNA-Strangbrüche mit Hilfe des „Comet Assay“ untersucht. Sowohl die Gesamt-Reparaturleistung (grüne Balken), als auch die Reparaturleistung bei Blockade der BER (rote Balken) zeigen innerhalb von 6 Monaten (zu beiden Zeitpunkten sensitiv) keinen signifikanten Unterschied. **B.)** Der relative Anteil der BER an der Gesamt-Reparaturleistung zeigt nur einen geringen Unterschied (35% gegenüber 43%).

3.3.4 Messung von Melphalan-induzierten DNA-Schäden im „Comet Assay“

Initial zeigt sich nach Inkubation mit Melphalan eine sehr variable relative Flächenvergrößerung im „Comet Assay“ mit einer fehlenden Reduktion des Kometen im Laufe der weiteren Beobachtungszeit. Da die anfänglich von Melphalan mit der DNA gebildeten Monoaddukte von DNA-Reparaturenzymen beseitigt werden, entstehen Einzelstrangbrüche, die im „Comet Assay“ messbar sind. Die Monoaddukte reagieren allerdings im weiteren Verlauf weiter zu Inter- und Intrastrang-DNA-Quervernetzungen, die eine verminderte Mobilität der DNA im „Comet Assay“ zur Folge haben. Durch die Ausbildung eines Gleichgewichts zwischen Reparatur-induzierten Einzelstrangbrüchen und Ausbildung von DNA-Quervernetzungen, kommt es zu einer lang anhaltenden, relativ konstanten Strangbruchrate. Daher ist die tatsächliche DNA-Reparaturleistung der untersuchten Zellen nach Melphalan-Exposition nicht hinreichend exakt zu analysieren.

3.3.5 Messung von Cisplatin-induzierten DNA-Schäden im „Comet Assay“

Im „Comet Assay“ wurden auch Zellen nach Inkubation mit Cisplatin auf Reparatur-induzierte Strangbrüche hin analysiert. Allerdings waren weder in NL noch in CLL-Lymphozyten DNA-Strangbrüche nachweisbar. Vermutlich führen die durch Cisplatin hervorgerufenen Interstrang-Quervernetzungen zu einer verminderten elektrophoretischen Auftrennung der DNA. Nur eine gleichzeitige Reparatur der DNA-Intrastrang-Addukte würde zu einer relativen Flächenvergrößerung im „Comet Assay“ führen. Allerdings ist unter diesen Bedingungen nicht nachweisbar, wie groß der Anteil der einzelnen Reparaturwege ist.

3.4 Microarray Analysen zur Untersuchung von Genexpressionsmustern bei CD19⁺-Lymphozyten

Um die spezifische Funktion einzelner Gene zu verstehen, ist es wichtig zu wissen wann, wo und in welchem Maße ein Gen exprimiert wird und wie die Aktivität sowie die biologische Rolle des kodierten Proteins aussieht.

Die Transkription der genomischen DNA in mRNA ist der erste Schritt im Prozess der Protein-Synthese und Unterschiede der Gen-Expression sind verantwortlich für morphologische und phänotypische Unterschiede sowie Indikatoren für zelluläre Antworten auf Entwicklungs-Stimuli und Störungen.

So konnten bisher als einheitlich angesehene Tumorentitäten, nach Charakterisierung ihrer Genexpression in mehrere distinkte Erkrankungen aufgeteilt werden (Alizadeh et al., 2000; Rosenwald & Staudt, 2003), sowie eine Sicherung der Diagnose und effektivere Behandlung ermöglicht werden (Staudt, 2003).

Die Nukleinsäure-Microarray-Technologie, welche auf der Hybridisierung von Fluoreszenz-gefärbten cRNA-Proben mit auf einer Glasoberfläche aufgetragenen Oligonukleotiden beruht, ermöglicht es die Genexpression einer Vielzahl von Genen in nur einem Experiment zu bestimmen. Diese Methode kann deshalb auch eingesetzt werden, um Einblicke in die Konstitution des hochkomplexen DNA-Reparatur-Netzwerks beispielsweise von CLL-Lymphozyten zu erhalten. Für die Analyse der wichtigsten DNA-Reparaturgene wurde der hier verwendete Microarray nach unseren Vorgaben von der Firma MWG Biotech hergestellt.

Entsprechend ihrer Funktion wurden aus einer Datenbank 158 DNA-Reparatur-Gene, 4 Normierungs-Gene und 24 Kontroll-Sequenzen ausgewählt (Benson et al., 1997; Boguski et al., 1993; Schuler et al., 1996). Die entsprechenden Gene wurden dabei jeweils von drei Oligonukleotid-Sequenzen mit einer Länge von 50 Nukleotiden repräsentiert, die zum 3'-Ende bzw. zum 5'-Ende, sowie zum mittleren Bereich der entsprechenden cRNA komplementär waren (Lipshutz et al., 1999). Zusätzlich befand sich von jedem Oligonukleotid noch ein entsprechendes Replikat auf dem Chip (Abb. 18). Zur Hybridisierung an den Microarrays war eine Amplifizierung der RNA notwendig, die hierzu in cDNA umgeschrieben wurde. Nach der Synthese des Zweitstrangs erfolgte die reverse Transkription (Milligan et al., 1987) und die Markierung mit Cy3- bzw. Cy5-gekoppelten UTPs (Mujumdar et al., 1993). Dadurch konnte jeweils eine Cy3- mit einer

Cy5-markierten cRNA zusammen auf einem Microarray hybridisiert werden (Fodor, 1993), um die Array-zu-Array Varianz zu minimieren (Abb. 19).

Abb. 20 zeigt exemplarisch einen MWG-Microarray. Dabei stehen die grünen Punkte für höher exprimierte Gene in der Cy3-markierten Probe und rote Punkte für höher exprimierte Gene in der Cy5-markierten Probe, während gelbe Punkte durch gleich hohe Genexpression beider Proben entsteht. Zusätzlich sieht man zur Normierung notwendige Kontroll-Spots mit „Houskeeping“-Genen. Die hier hybridisierte cRNA entspricht der mRNA der B-Lymphozyten einer einzelnen Blutprobe pro Farbstoff.

Basen Exzisions Reparatur MPG MTH MYH NTH1 OGG1 TDG UDG APE POLβ DNA Ligase III	Nukleotid Exzisions Reparatur DDB 1 DDB 2 XP-A C4ORF1 RPA1 XP-C HHR23B XPE XP-B XP-D CS A CS B RNA POL2 TFIIH 2 TFIIH 3 TFIIH 4 XP-F ERCC 1 XP-G PCNA RFC POL δ POL ε POL ι POL ζ POL η DNA Ligase I BAP 1 RAD23A	Direkte Reparatur MGMT Mismatch Reparatur MLH 1 MSH 2 MSH 3 MSH 4 MSH 5 MSH 6 PMS 1 Rekombination RAG1 RAG2 PMS 2	Doppelstrang-Bruch Reparatur ATM BRCA2 BS DNA Ligase IV DNA-PKcs FA-A FA-C FEN-1 KU 70 KU 86 MRE11 NBS1, XRS2 RAD 50 RAD 51 RAD 52 RAD 54 WS XRCC 1 XRCC 2 XRCC 4 XRCC 9	DNA Schäden und Stress-Antwort BAD BAK BAX BCL-2 BCL-X CASPASEN-1 bis 10 FAS/CD95 (APO-1) P 53 MDM 2 P 21 P53 R2 P 73 GADD 45 GADD 153 HMG 1 HMG 2 NFKB1 PARP [PARG] RAD17 RAD9 RAF C-FOS C-JUN GSTP 1 MDR 1 MRP 1 MRP 2 MRP 3 MRP 6 MT 1A
--	---	---	--	---

Abb. 18: **Belegung des MWG Pan Array.** Der Microarray enthält Hybridisierungssequenzen für 158 Gene der DNA-Reparatur sowie der Zellzyklus- (nicht dargestellt) und Apoptose-Regulation. Die entsprechenden Gene werden jeweils von drei Oligonukleotid-Sequenzen mit einer Länge von 50 Nukleotiden repräsentiert. Zusätzlich enthält der Microarray 4 Normierungs-Gene und 24 Kontroll-Sequenzen, sowie ein entsprechendes Replikat jedes Oligonukleotids auf dem Chip.

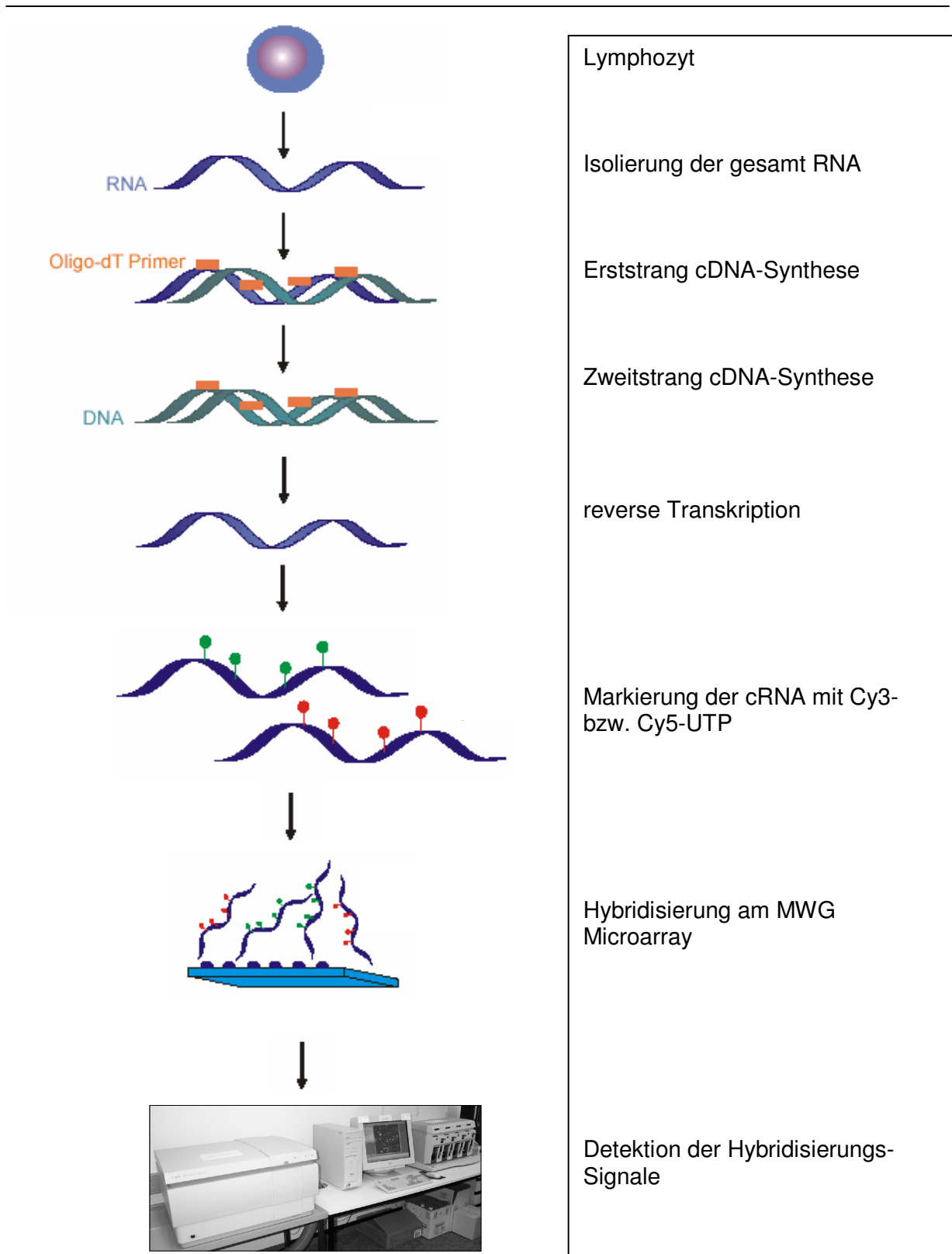


Abb. 19: Schematische Darstellung der RNA-Amplifizierung, Markierung der cRNA und Hybridisierung am MWG Pan Array. (Modifiziert nach T. Braker (IFZ)).

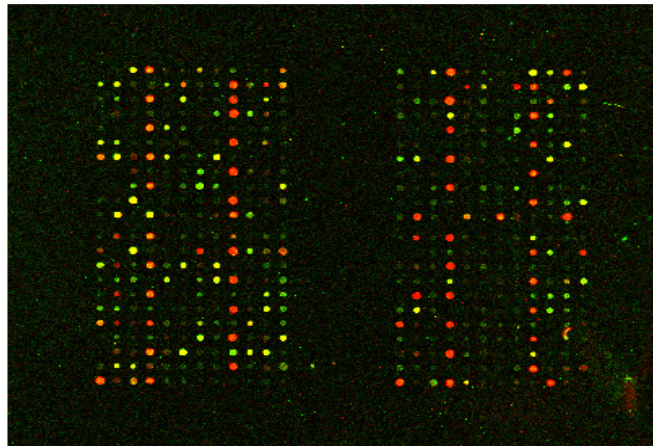


Abb. 20: Hybridisierung auf dem MWG Pan Array. Foto eines MWG Pan Array. Durch die Doppelhybridisierung können zwei Proben mit verschiedenen Farbstoffen (Cy 3 bzw. Cy 5) an einem Array untersucht werden. Grüne Punkte repräsentieren höher exprimierte Gene im Cy 3 Kanal (FE 35), rote Punkte höher exprimierte Gene im Cy 5 Kanal (BJ20). Gelbe Punkte stellen eine gleich hohe Hybridisierung beider Farbstoffe da. Außerhalb der Oligonukleotid-Spots ist z.T. unspezifisches Hintergrundsignal sichtbar.

3.4.1 Vergleichbarkeit der Cy3- und Cy5-Markierung

Um die Vergleichbarkeit der Cy3- und Cy5-Markierung zu untersuchen, wurden jeweils für beide Farbstoffe RNA-Proben von Lymphozyten eines Patienten auf einem Array untersucht. Dabei wurden für jeweils beide Proben die Signale der drei Oligonukleotide pro Gen gemittelt und die logarithmierten Mittelwerte gegeneinander aufgetragen (Abb. 21). Bei völliger Übereinstimmung sollte sich in der graphischen Darstellung eine Gerade ergeben. Wenn dies nicht in allen Bereichen aufgrund variabler Hybridisierung komplett erreicht wird, liegt z.B. eine „Spearman rank“-Korrelation von 0,934 bei CLL 892 bzw. 0.961 bei CLL 889 vor.

3.4.2 Reproduzierbarkeit der Proben auf unterschiedlichen Microarrays

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Hybridisierung wurden Zell-Proben gleicher Spender mit Cy3 bzw. Cy5 markiert und auf unterschiedliche Arrays aufgetragen. Des Weiteren folgten Versuchsreihen mit unterschiedlichen cRNA-Konzentrationen, um die Sensitivität und Reproduzierbarkeit für variable Mengen an Ausgangsmaterial zu überprüfen.

Sowohl für Cy3 (CLL 890) als auch für Cy5 (CLL 903, BJ20) lag eine „Spearman rank“-Korrelation von 0,821 bis 0,993 vor. Dabei wurden um den Faktor vier unterschiedliche Mengen an cRNA (5-20 µg) pro Array eingesetzt (Abb. 22).

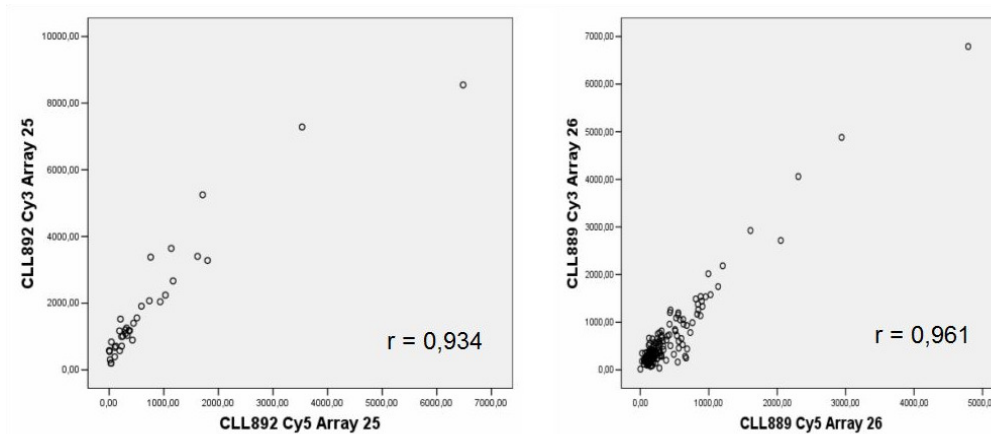


Abb. 21: Reproduzierbarkeit der Hybridisierung der zwei Farbstoffe auf einem Microarray. A.)-B.) stellen die Verteilungsdiagramme der Signalintensitäten von CLL-Proben auf einem Microarray dar. Aufgetragen sind die absoluten Signalintensitäten aus den Microarray Analysen (logarithmische Skalierung). Auf einem Array sind jeweils die Cy3- bzw. Cy5-markierte cRNAs aus einer CLL-Probe hybridisiert. r = Spearman'scher Rangkorrelations-Koeffizient

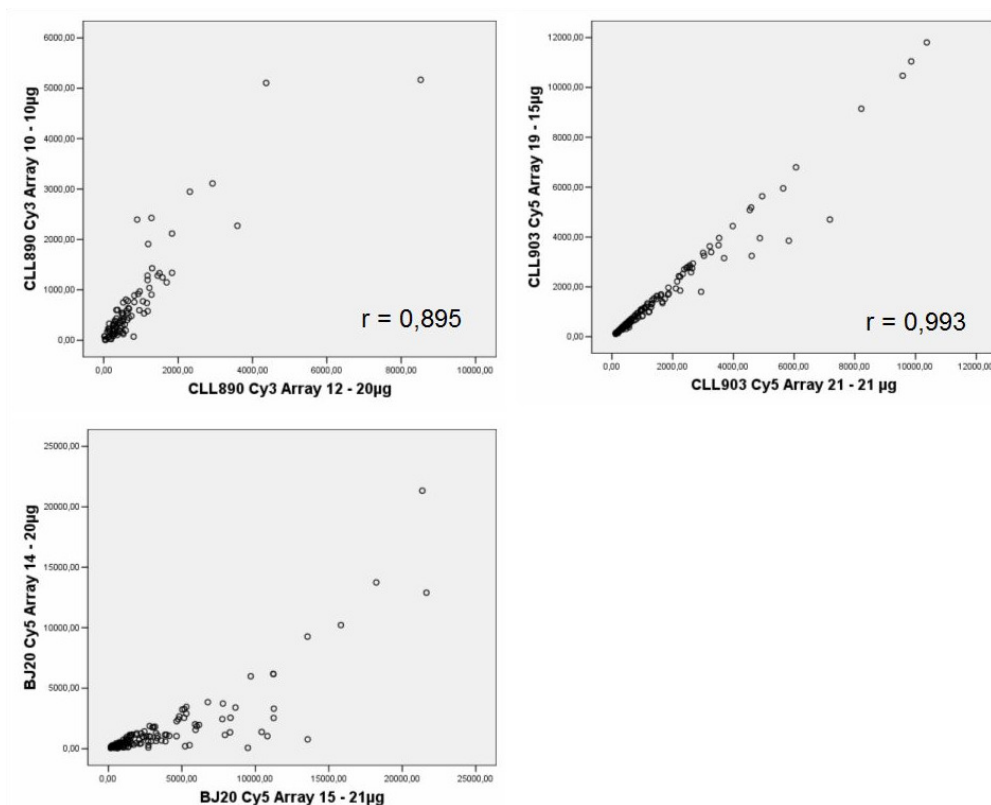


Abb. 22: Reproduzierbarkeit der Hybridisierung von CLL-Proben auf unterschiedlichen Microarrays. A.)-D.) stellen die Verteilungsdiagramme der Signalintensitäten von CLL-Proben mit jeweils einem Farbstoff (CLL 890 – Cy3, CLL 903 – Cy5, BJ20 – Cy5) auf unterschiedlichen Microarrays da. Aufgetragen sind die absoluten Signalintensitäten aus den Microarray Analysen (logarithmische Skalierung). Auch die Menge der eingesetzten mRNA wurde variiert (CLL 890: 10µg bzw. 20µg; CLL 903: 15µg bzw. 21µg; BJ20: 20µg bzw. 21µg). r = Spearman'scher Rangkorrelations-Koeffizient

3.4.3 RNA-Expressionsanalyse von CD19⁺-Lymphozyten

Zur Beantwortung der Frage, ob die klinische Resistenz gegenüber Chemotherapeutika bei CLL-Patienten und ein veränderter Reparaturphänotyp der Tumorzelle sich in einem veränderten Expressionsmuster von DNA-Reparaturgenen in diesen Zellen widerspiegelt, wurden die Datensätze von 65 CLL-Proben und 2 NL-Proben ausgewertet.

Die CLL-Proben stammen von insgesamt 49 verschiedenen Patienten. Bei einigen Patienten wurden zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen, um Änderungen der Expressionsprofile im Krankheitsverlauf analysieren zu können. Entsprechend ihres klinischen Ansprechens auf die jeweilige Therapie wurden die CLL-Patienten in verschiedene Gruppen eingeteilt (Tab. 3).

Im weiteren Verlauf werden in der „sensitiven“ Gruppe die Patienten zusammengefasst die bisher keine Behandlungsindikation aufweisen oder auf die Chlorambucil-Therapie bisher angesprochen hatten. Bei den Patienten, bei denen eine Chemotherapie mit Fludarabin begonnen wurde, hatte bereits eine Resistenz-Entwicklung eingesetzt. Daher werden diese, zusammen mit den auch gegen diese Therapie schon resistenten Patienten, in die „resistente“ Gruppe eingeordnet.

Status	Anzahl der Patienten	Anteil der Patienten [%]
keine Behandlungsindikation	16	33
Therapie sensitiv	12	25
Therapie Fludarabin + Interferon	4	8
Therapie resistent	6	12
unklarer klinischer Status	11	22

Tab. 03: **Behandlungsstatus der CLL-Patienten, deren Genexpression mittels Microarrays analysiert wurde.**

3.4.4 Untersuchung des Genexpressionsmusters von CLL-Lymphozyten im Hinblick auf die DNA-Reparaturkapazität

In den vorangegangenen Untersuchungen zeigte sich bei den meisten der „resistenten“ CLL-Patienten eine Erhöhung der funktionellen DNA-Reparaturkapazität.

Zur Untersuchung des Unterschieds zwischen „sensitiven“ und „resistenten“ Proben, wurden die Expressionswerte der DNA-Reparaturgene miteinander korreliert (Abb. 23).

Als Maß für die Ähnlichkeit der Genexpression wurde die Pearson'sche Rangkorrelation verwendet. Dabei stellte sich heraus, dass die Korrelation der Mittelwerte der Expression von DNA-Reparaturgenen zwischen sensiblen und resistenten Proben sehr hoch war ($r = 0,968$), im Gegensatz dazu war die Korrelation im Vergleich zu normalen Lymphozyten wesentlich geringer. Bei „sensiblen“ im Vergleich zu normalen Lymphozyten liegt die Korrelation bei $r = 0,849$ und bei „resistenten“ im Vergleich zu normalen Lymphozyten bei $r = 0,764$.

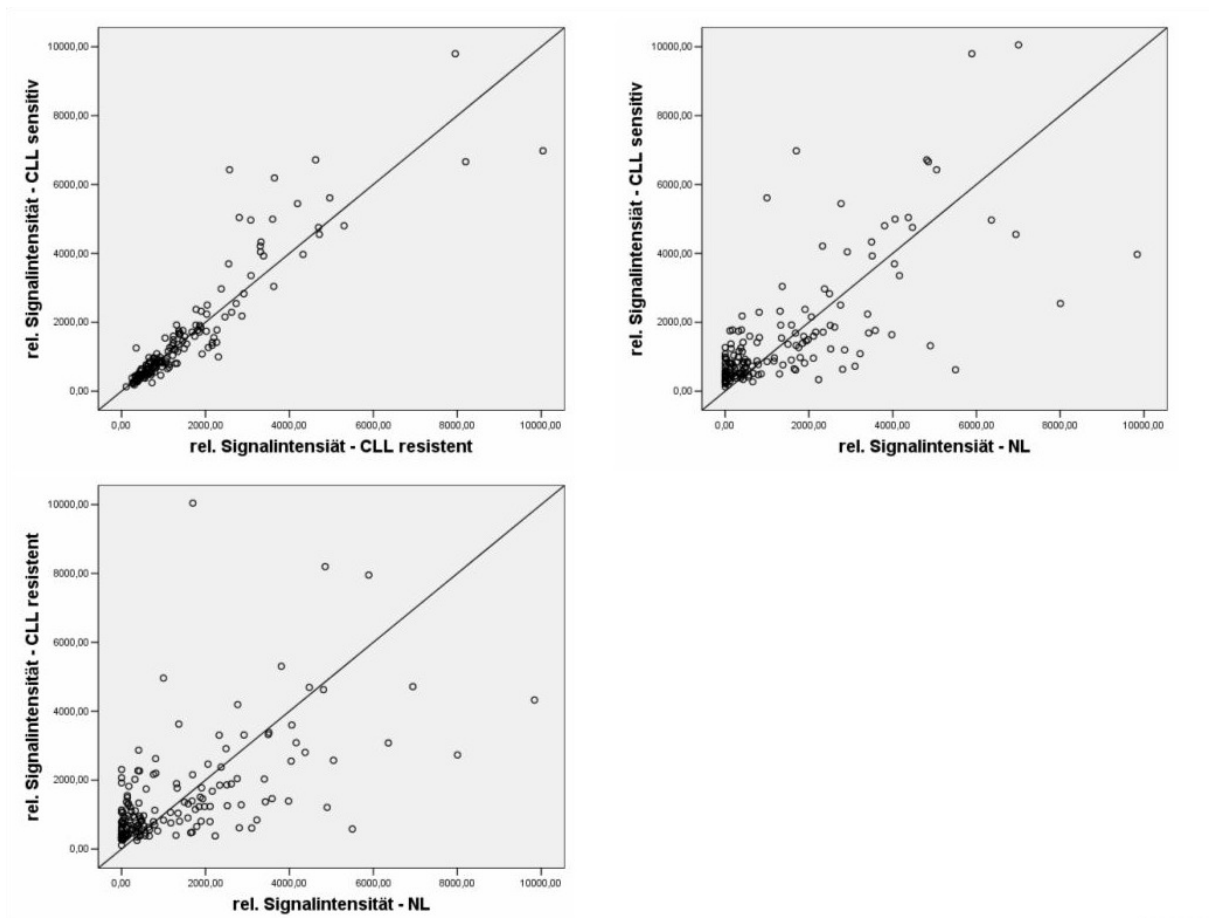


Abb. 23: **Korrelation der Expression von DNA-Reparaturgenen zwischen verschiedenen Patienten Kollektiven.** Korrelation der Expression (relative Signalintensität mit logarithmischer Skalierung) von 158 DNA-Reparaturgenen zwischen **A.)** den Mittelwerten aller resistenten CLL-Patienten gegenüber denen aller sensiblen CLL-Patienten ($r = 0,968$), **B.)** den Mittelwerten aller sensiblen CLL-Patienten gegenüber denen der normalen Probanden ($r = 0,849$) und **C.)** den Mittelwerten aller resistenten CLL-Patienten gegenüber denen der normalen Probanden ($r = 0,764$). r = Pearson'scher Rangkorrelations-Koeffizient

Dieser Befund könnte auf eine Verschiebung in dem Profil der Expression der Reparaturgene hindeuten, die im weiteren Verlauf der Erkrankung voran schreitet, wie

der Vergleich von Proben eines CLL-Patienten im Laufe der Chemotherapie-Resistenzentwicklung zeigt (KT-29).

Während die Proben des Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Entwicklung der Chlorambucil-Resistenz eine Pearson'sche Rangkorrelation von $r = 0,982$ aufweisen, ist die Korrelation zur Expression einer Zell-Probe vor dieser Resistenz-Entwicklung mit $r = 0,811$ deutlich niedriger (Abb. 24).

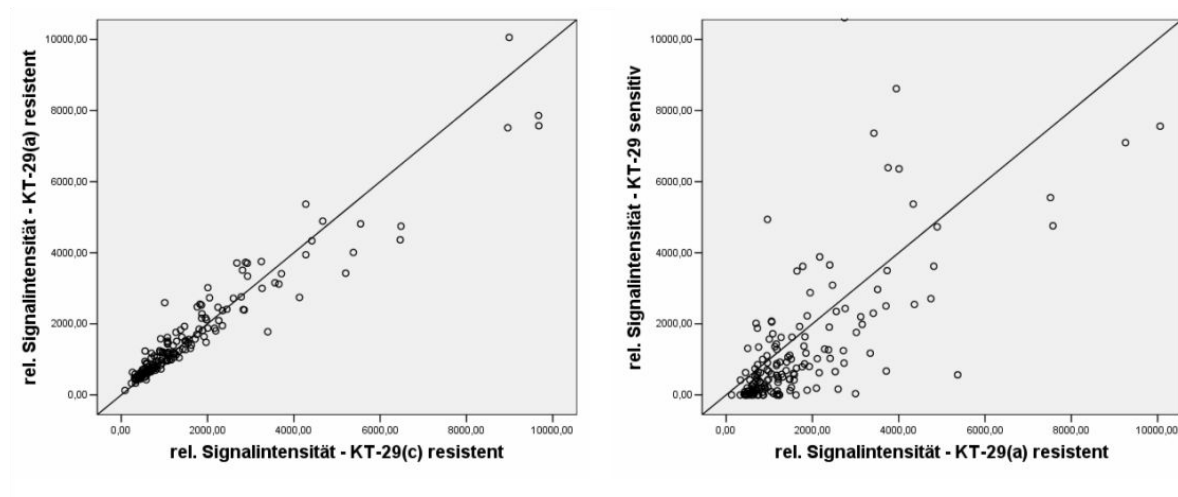


Abb. 24: Korrelation der Expression von DNA-Reparaturgenen zwischen verschiedenen Zeitpunkten eines CLL-Patienten. Korrelation der Expression (relative Signalintensität mit logarithmischer Skalierung) von 158 DNA-Reparaturgenen zwischen **A.)** zwei Zeitpunkten in denen der Patient (KT29) zur resistenten Therapiegruppe gehört ($r = 0,982$) und **B.)** zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Resistenzentwicklung (sensitiv – resistent) ($r = 0,811$). r = Pearson'scher Rangkorrelations-Koeffizient

3.4.5 Clusteranalyse der Genexpressionsmuster von CD19⁺-Lymphozyten

Zum Vergleich der Arrays untereinander diente die hierarchische Clusteranalyse. Die relative Fluoreszenz-Intensität der 158 untersuchten Gene wurde nach Logarithmierung und Normalisierung über alle Arrays normiert (Eisen et al., 1998). Um Fehler durch unregelmäßig exprimierte Gene auszuschließen, wurden nur Gene berücksichtigt, die in mindestens 80 % der Fälle als „present“ gefunden wurden (155 von 158). Die Clusteranalysen erfolgten mit der Korrelation als Ähnlichkeitsmaß (Jain et al., 1988).

Bei der „unsupervised“ Clusteranalyse, stellte sich heraus, dass die Unterschiede in der Genexpression zu gering, oder innerhalb der Subgruppen zu unterschiedlich sind, um die Proben anhand ihres Ansprechens auf die Chemotherapie unterscheiden zu können (Abb. 25a).

Für die funktionellen Unterschiede, welche die Resistenz gegenüber einer Chemotherapie bedingen, scheint somit kein einheitliches Expressionsmuster der DNA-Reparaturgene verantwortlich zu sein.

Alternativ wurde eine „supervised“ Clusteranalyse durchgeführt (Korrelation als Ähnlichkeitsmaß) unter Vorgabe der verschiedenen CLL-Gruppen (Abb. 25b). Auch hier zeigte sich kein Reparaturweg, der in den unterschiedlichen Gruppen differentiell höher exprimiert wurde.

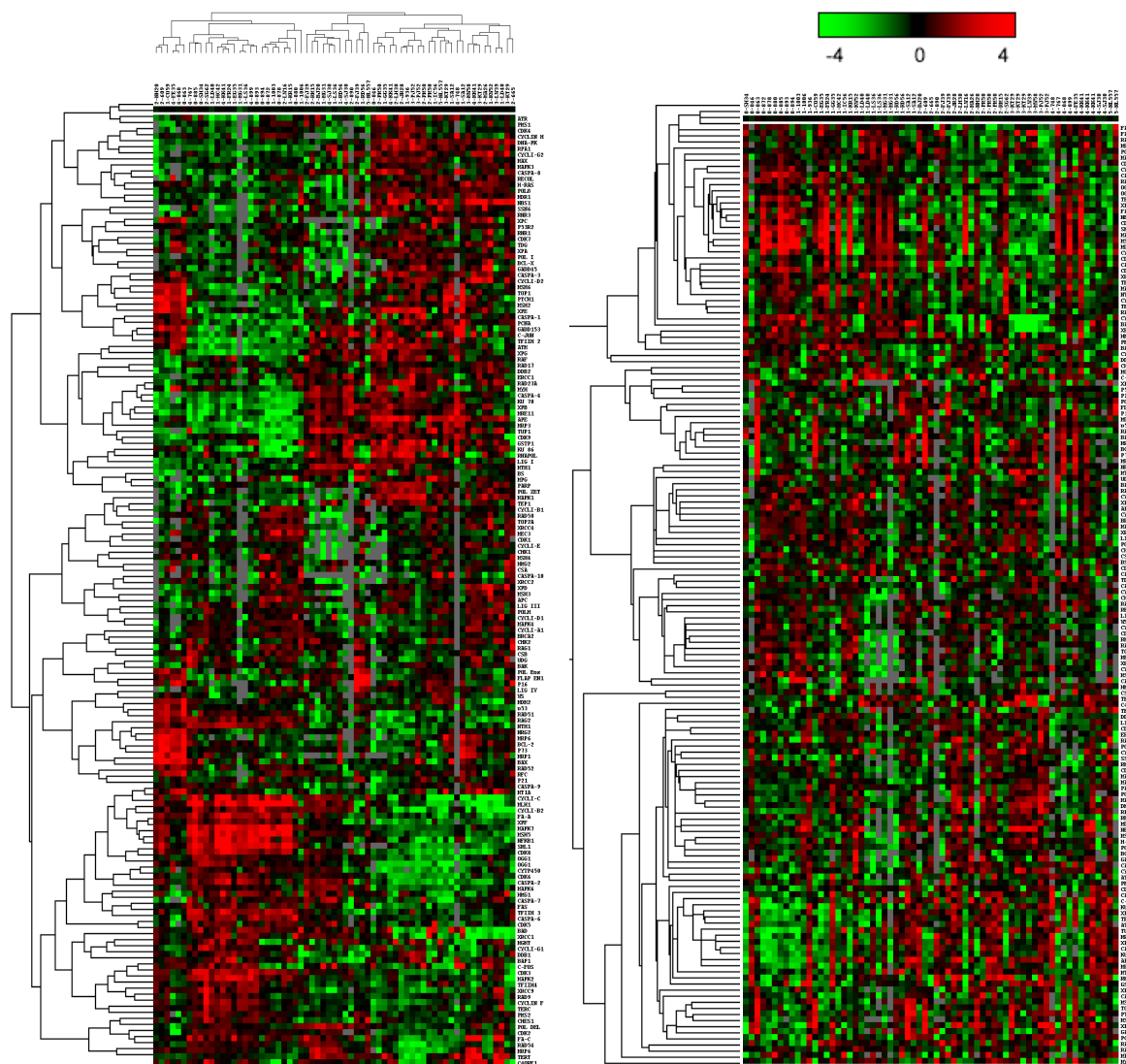
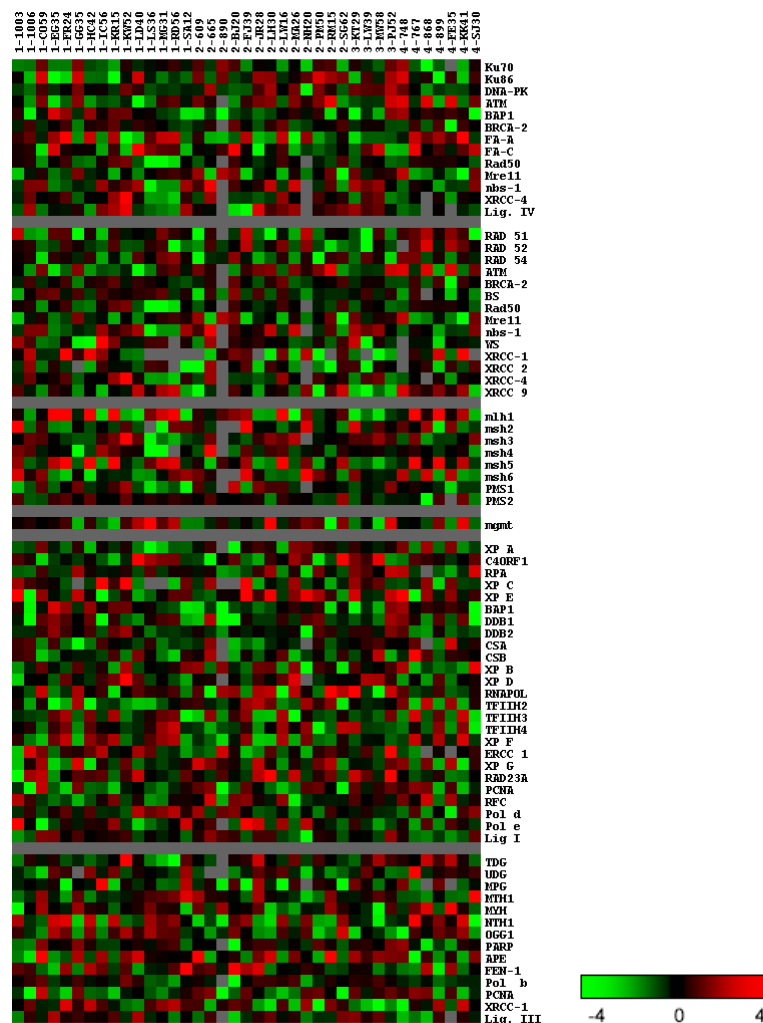


Abb. 25: Hierarchische Clusteranalyse von CLL-Proben. Die Expressionssignale der Probesets wurden auf ihre mittlere Signalintensität normiert und logarithmiert. Probesets mit mehr als 30% „present calls“ wurden einer „unsupervised“ Clusteranalyse unterzogen. Die relative Expressionshöhe wird durch rote (bis zu + 4fach) bzw. grüne Farbe (bis zu – 4fach) ausgedrückt. Der Mittelwert der Expression erscheint schwarz. (Programm : Gene Cluster)



64

3.4.6 Genexpressionsanalysen der individuellen DNA-Reparaturwege

Da die Betrachtung der Clusteranalyse keinen Aufschluss über die Regulation der Expression bei einzelnen Reparaturwegen gab, erfolgte die Auswertung der Genexpressionsmuster entlang dieser distinkten Wege. Diese Darstellung der individuell sehr unterschiedlich exprimierten DNA-Reparaturgene, scheint daher eher in der Lage zu sein, die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika zu erklären als eine „globale“ Änderung der funktionellen DNA-Reparaturgeschwindigkeit.

Basen-Exzisions-Reparatur

Bei der detaillierten Untersuchung des BER-Weges stellten sich durchaus Unterschiede heraus. Auch wenn bei zunehmender klinischer Resistenz keine generell höhere bzw. tiefere Expression aller Gene dieses Reparaturweges sichtbar wird, so zeigte sich bei einigen Genen eine differentielle Expression. Während diese z.B. bei MYH (Mut Y Homolog), PARP, DNA-Polymerase β , DNA-Ligase III deutlich höher ist als bei normalen Lymphozyten gefunden wurde, war sie geringer bei MPG (DNA-3-Methyladenin Glykosylase), MTH1 (Mut T Homolog) und FEN-1 (Flap Endonuclease 1). Dies legt den Schluss nahe, dass es Schlüsselenzyme gibt, welche die Geschwindigkeit und Effizienz einzelner Reparaturwege maßgeblich beeinflussen. Andererseits beschränkt sich die Resistenzentwicklung sehr wahrscheinlich nicht auf die Veränderung in einem Reparaturweg alleine (Abb. 27).

Betrachtet man individuelle CLL-Proben im Vergleich zu den Mittelwerten der jeweiligen Therapiegruppe, zeigen sich wieder stark unterschiedliche Expressionen. Während die BER-Gene bei einigen Proben fast durchweg höher exprimiert sind als der Mittelwert ihrer Gruppe (z.B. FJ-39 sensitiv), ist die Expression bei anderen größtenteils geringer als der Mittelwert (z.B. PJ-52 Fludarabin). Auch diese Schwankungen legen nahe, dass die gesteigerte DNA-Reparaturkapazität, die resistente Zellen in der funktionellen Analyse aufweisen, nicht mit der Regulation eines einzelnen Reparaturweges zu erklären ist (Abb. 28).

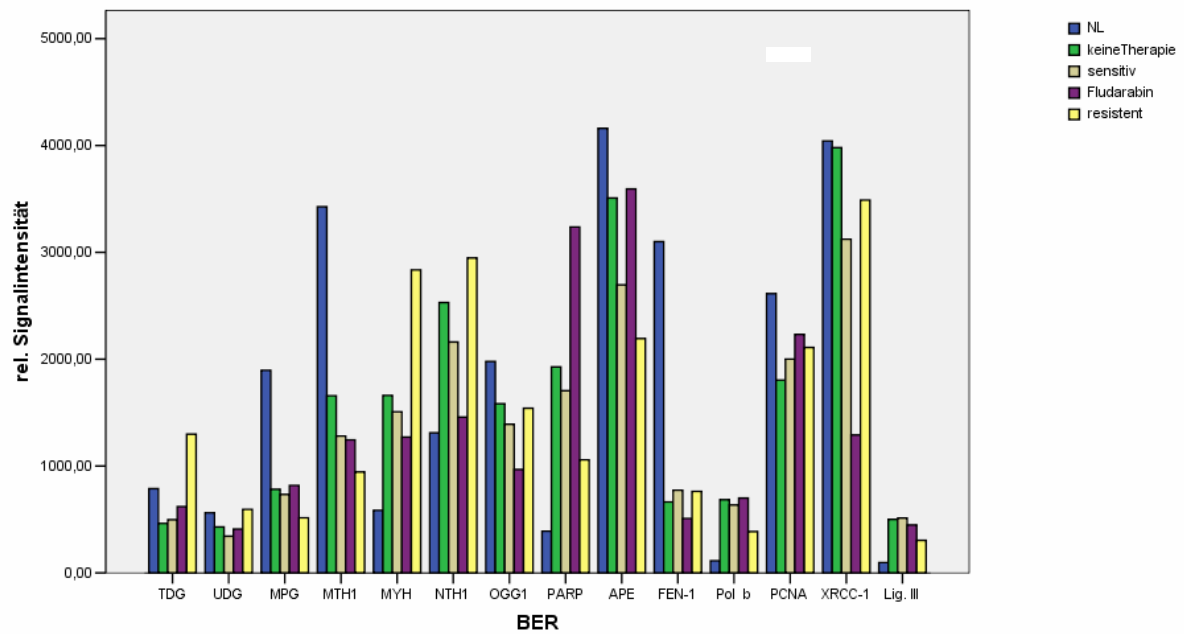


Abb. 27: Expression von Genen der BER in Abhängigkeit von der Therapiegruppe. Expressionen (relative Signalintensität) von normalen Lymphozyten im Vergleich zu 65 Probesets von CLL-Patienten geordnet nach der Zugehörigkeit zu den verschiedenen Therapiegruppen (keine Therapie – sensitiv- Fludarabin – resistent).

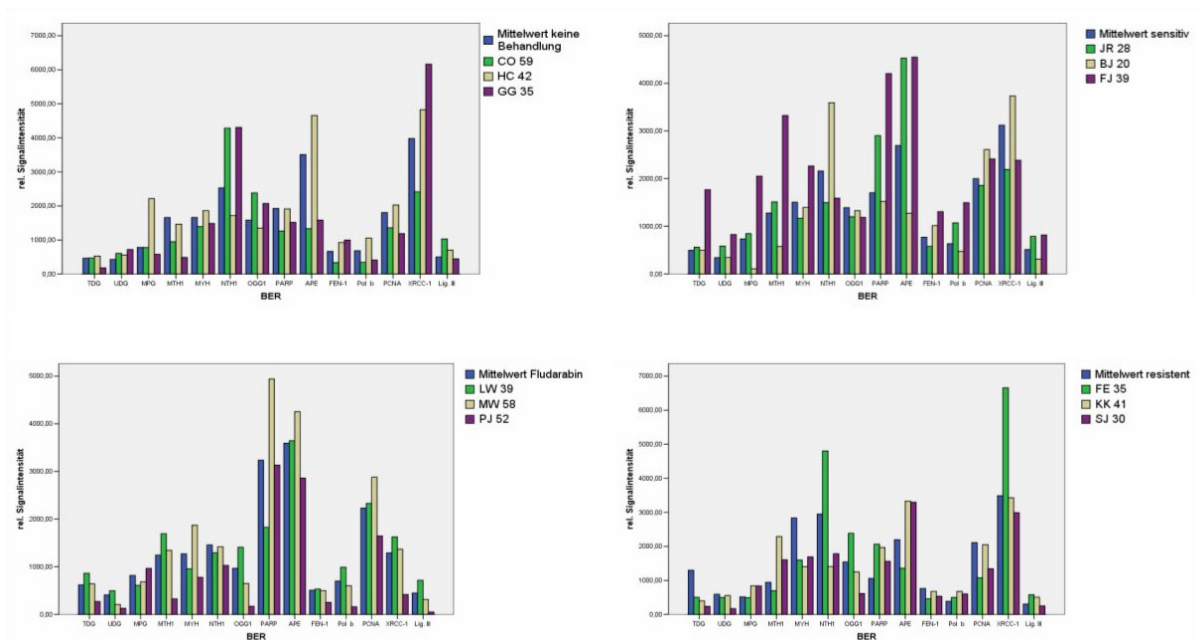


Abb. 28: Expression von Genen der BER bei den Tumorzellen einzelner CLL-Patienten im Vergleich zum Mittelwert ihrer Therapiegruppe. Expression (relative Signalintensität) der Mittelwerte der jeweiligen Therapiegruppe im Vergleich zu A.) CLL-Patienten ohne Behandlungsindikation, B.) sensitiven Patienten, C.) Patienten mit Fludarabin-Therapie und D.) resistenten Patienten.

Beim Vergleich zwischen Genexpression, Anteil der BER im „Comet Assay“, Reparaturphänotyp und klinischer Resistenzentwicklung werden einige Gene auffällig unterschiedlich exprimiert, ohne dass man jedoch einen ansteigenden Trend bestimmter Gene mit zunehmendem Anteil der BER an der Gesamt-Reparatur erkennen kann. Auffällig ist hier wiederum die hohe MYH-Expression bei der „resistenten“ CLL-Probe 767 (Tab. 4; Abb. 29).

Probe	Anteil BER [%]	Reparatur-Phänotyp	Therapie
CLL 417	35	langsam	sensitiv
CLL 609	55	langsam	sensitiv
CLL 767	73	schnell	resistent
CLL 936	60	langsam	keine
CLL 1006	32	langsam	keine

Tab. 04: Vergleich des Anteils der BER an der Gesamt-Reparaturleistung, dem Reparatur-Phänotyp und dem Therapiestatus einzelner CLL-Patienten. Die Genexpressionsanalysen der hier aufgeführten Patienten sind in Abb. 30 dargestellt.

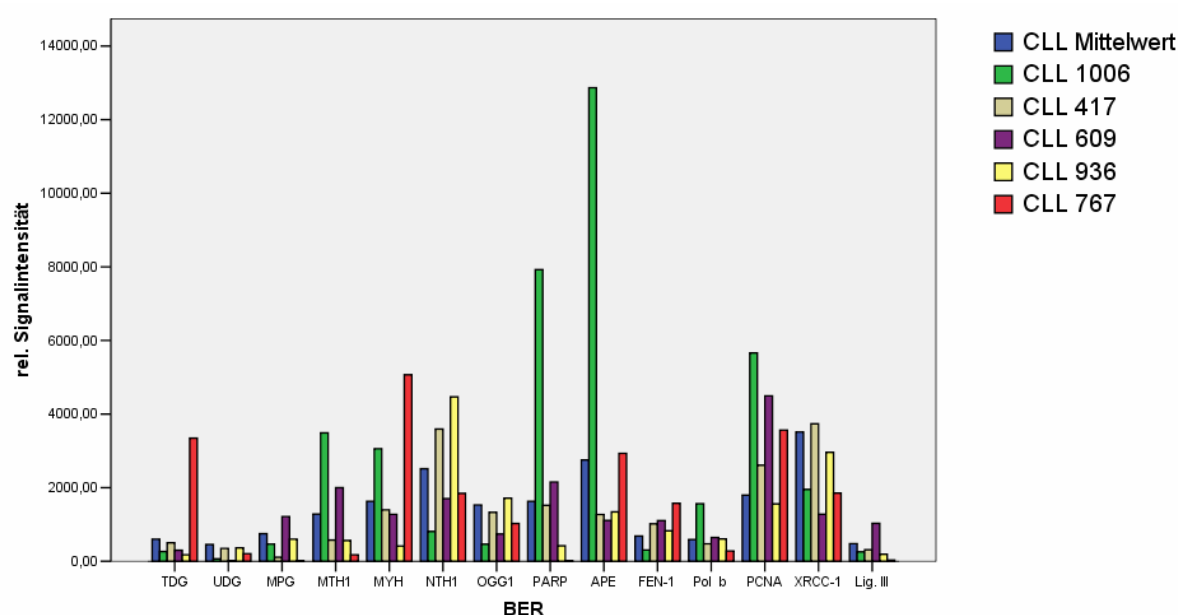


Abb. 29: Vergleich von Expression der BER-Gene, Anteil der BER an der Gesamt-Reparaturleistung und dem Reparatur-Phänotyp einzelner CLL-Patienten. Expression (relative Signalintensität) einzelner Probesets im Vergleich zu Mittelwert. Den einzelnen CLL-Patienten wurden jeweils ihr (mittels „Comet Assay“ ermittelten) Anteil der BER an der Gesamt-Reparaturleistung sowie ihr Reparatur-Phänotyp zugeordnet (Tab. 4).

Doppelstrangbruch-Reparatur

Bei der Betrachtung der relativen Signalintensität von an der Doppelstrangbruch-Reparatur beteiligten Gene, fällt vor allem die extrem hohe Expression der Exonuklease Mre11 auf (Abb. 30). Der Proteinkomplex Mre11-Rad50-Nbs1 gilt mittlerweile als Schlüsselkomponente der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur und dient der Erkennung und Stabilisierung von DSB, der Zellzyklus-Kontrolle und der funktionellen Regulation der Chromatin-Remodelierung in der Nähe von DSB (Williams et al., 2007).

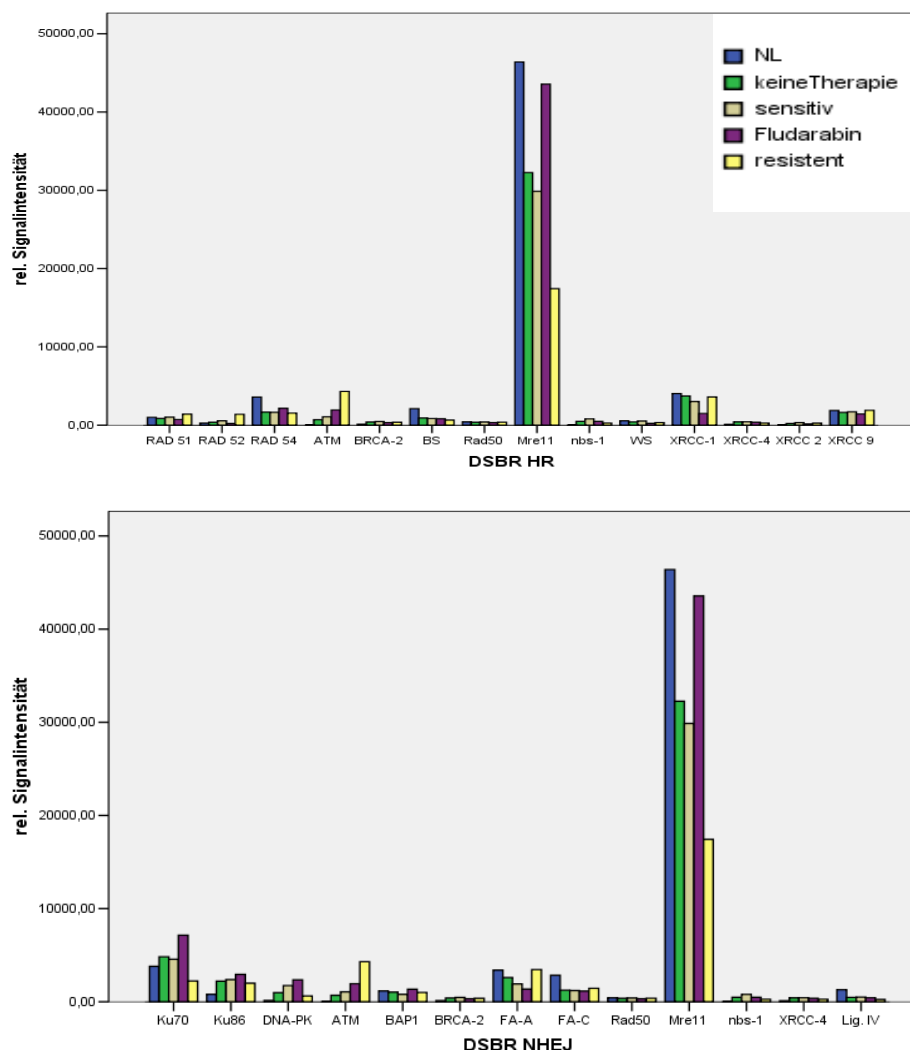


Abb. 30: Expression von Genen der DSBR in Abhängigkeit von der Therapiegruppe. Expression (relative Signalintensität) von normalen Lymphozyten im Vergleich zu den Mittelwerten der verschiedenen Therapiegruppen bei A.) homologer Rekombination und B.) „non-homologous end-joining“.

Die Mittelwerte zwischen sensiblen und resistenten Proben zeigen keinen signifikanten Unterschied (Abb. 31a), wobei sich bei der Untersuchung der einzelnen Proben zeigt, dass wiederum sehr unterschiedliche individuelle Genexpressionsmuster vorliegen und in jeder der Therapiegruppen Proben sowohl unter als auch zum Teil weit über dem Mittelwert aller Proben liegen (Abb. 31b) und so keine charakteristisch hohe bzw. geringe Genexpression einer einzelnen Gruppe vorliegt.

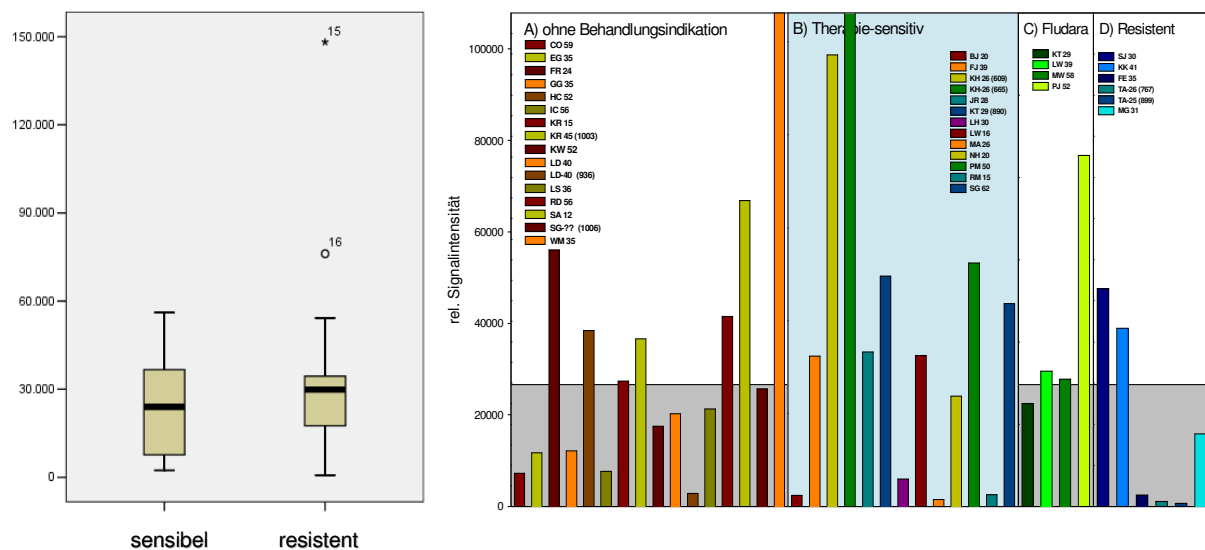


Abb. 31: **Expression von Mre11:** A.) in Abhängigkeit von der Therapiegruppe. Streuung der Expression (relative Signalintensität) von sensiblen (keine Therapie oder Therapie-sensitiv) und resistenten (Fludarabin oder komplette Therapieresistenz) CLL-Proben. Box: 25-75% Quartile, Whisker: Spannweite, Linie innerhalb der Box: Median. B.) In einzelnen CLL-Proben. Exemplarische Darstellung der Expression (relative Signalintensität) einzelner CLL-Proben der verschiedenen Therapiegruppe zur Darstellung individueller Unterschiede. Die Linie zwischen dem weißen und grauen Anteil entspricht dem Mittelwert aller CLL-Proben.

Beim Vergleich der restlichen Gene (Abb. 32a) des NHEJ der DSB-Reparatur sind Ku86, DNA-PK und ATM in CLL-Lymphozyten höher exprimiert als in NL, während andererseits die Expression von FA-C, DNA-Ligase IV erniedrigt ist.

Bei der homologen Rekombination der DSB-Reparatur sind neben ATM auch BRCA-2, Nbs1 und XRCC-2 / -4 in CLL-Lymphozyten höher exprimiert, während die Expression von Rad54 und BS deutlich geringer ist als in NL (Abb. 32b).

Besonders hervorzuheben ist die im Laufe der Resistenz-Entwicklung zunehmende ATM-Expression, eines der Schlüsselenzyme der DSB-Reparatur (Abraham, 2001; Shiloh, 1997). Dabei ist der Mittelwert der resistenten Zellen signifikant ($p < 0.005$) höher als der der anderen Therapiegruppen (Abb. 33).

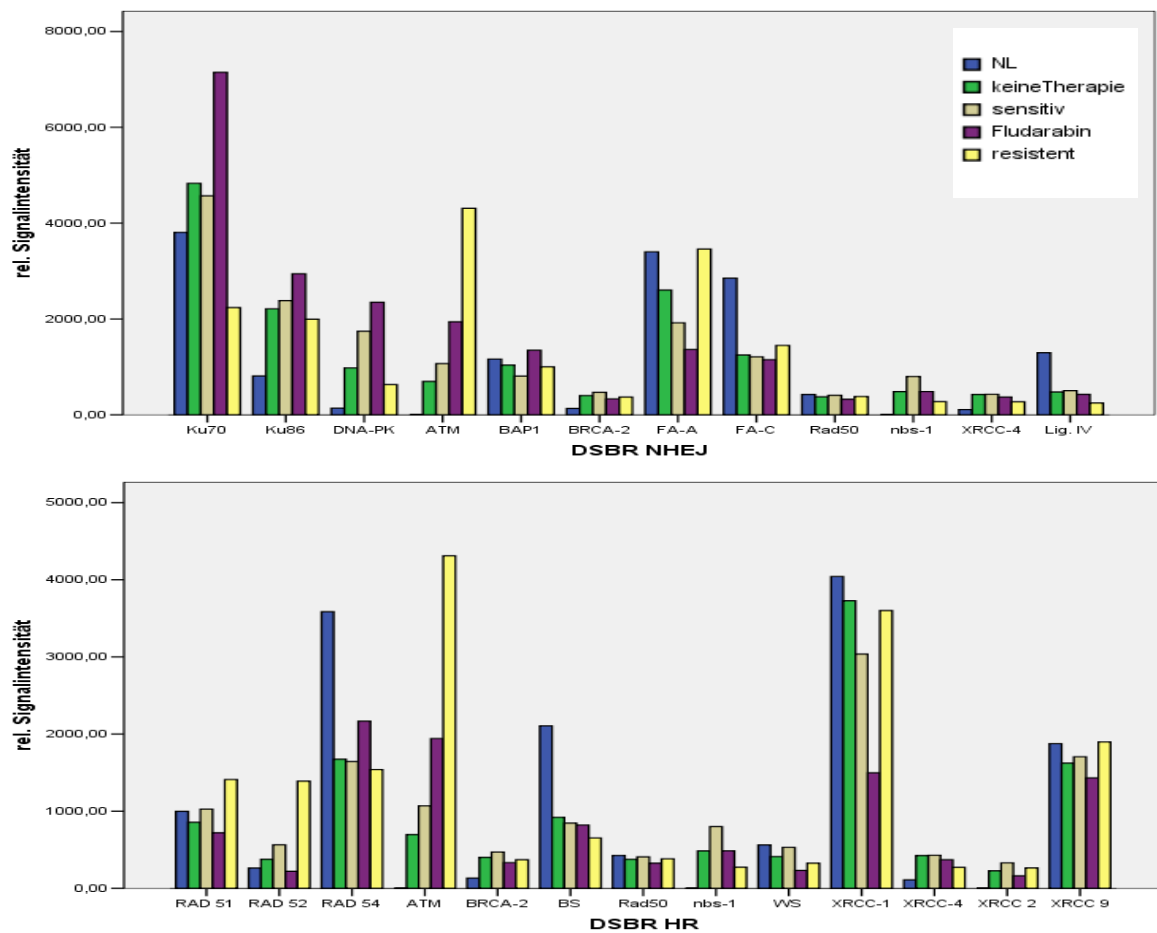


Abb. 32: Expression von Genen der DSBR in Abhängigkeit von der Therapiegruppe (ohne Mre11). Dargestellt sind die Mittelwerte der Expression (relative Signalintensität) der verschiedenen Therapiegruppen. A.) „non-homologous end-joining“, B.) homologe Rekombination.

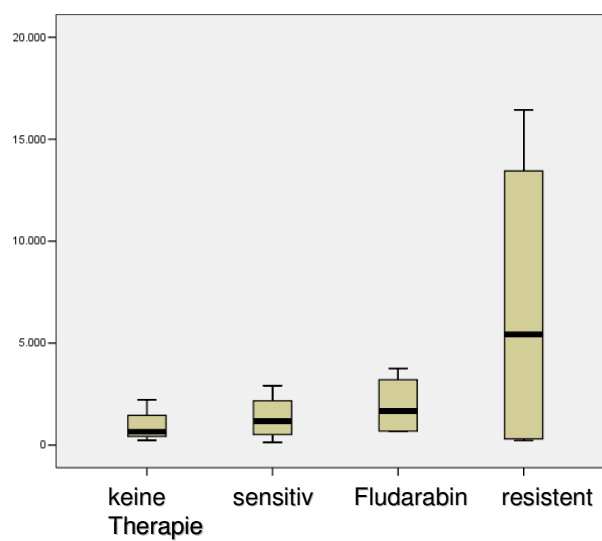


Abb. 33: Expression von ATM in Abhängigkeit von der Therapiegruppe. Box: 25-75% Quartile, Whisker: Spannweite, Linie innerhalb der Box: Median.

Nukleotid-Exzisions-Reparatur

Da CLL-Lymphozyten sich in der G_1/G_0 -Phase des Zellzyklus befinden und aufgrund der fehlenden Zellteilung von der Proliferation abhängige DNA-Reparaturmechanismen nicht zum Einsatz kommen können, spielt die Transkriptions-gekoppelte DNA-Reparatur, die ausschließlich die kleine Gruppe aktiver Gene betrifft, eine besonders wichtige Rolle.

Wie bei den anderen Reparaturwegen zeigt sich eine breite individuelle Streuung der Genexpression einzelner CLL-Proben. Auch hier liegen Änderungen der Expression einzelner Gene und keine generelle Regulation aller beteiligten Gene im Laufe der Resistenz-Entwicklung vor (Abb. 34).

Bei CLL-Lymphozyten sind unter anderem XPE, DDB1, TFIIH 2/3/4, ERCC1, RAD23A, DNA-Ligase I und vor allem die an der Entdeckung der DNA-Schäden maßgeblich beteiligte RNA-Polymerase II höher exprimiert, während in normalen Lymphozyten nur die Gene von XPB und DNA-Polymerase ϵ höher exprimiert sind.

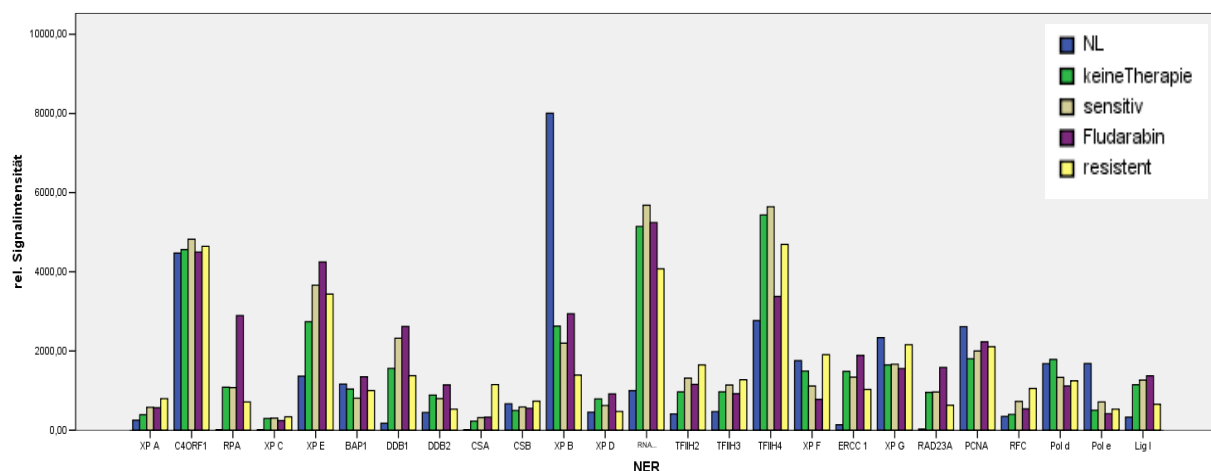


Abb. 34: Expression von Genen der NER in Abhängigkeit von der Therapiegruppe. Expression (relative Signalintensität) von normalen Lymphozyten im Vergleich zu den Mittelwerten bei CLL-Zellen der verschiedenen Therapiegruppen.

Einschritt-Reparatur

Hier liegen keine statistisch signifikanten Änderungen des Mittelwerts der verschiedenen Therapiegruppen vor. Da dieser Reparaturweg vor allem die Zytotoxizität von DNA-Alkylierungsprodukten während der DNA-Replikation beeinflusst und deshalb den sich in der G₁/G₀-Phase des Zellzyklus befindlichen CLL-Lymphozyten keinen Überlebensvorteil bietet, scheint dieses Reparaturenzym keinen Einfluss auf die Resistenzentwicklung zu haben (Abb. 35).

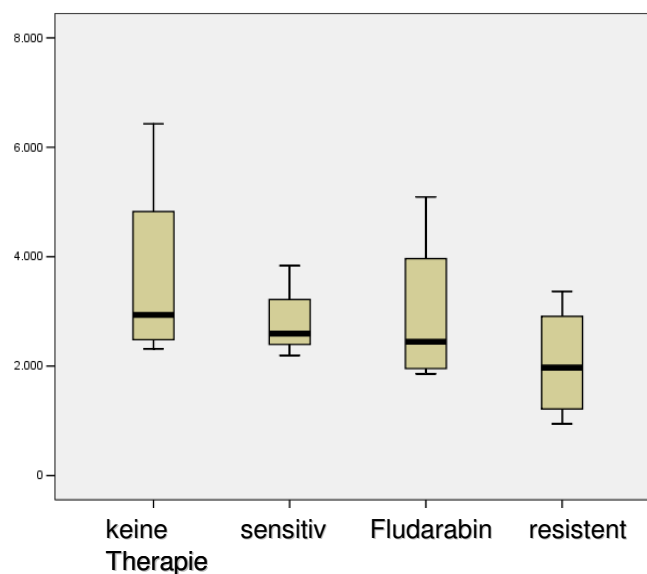
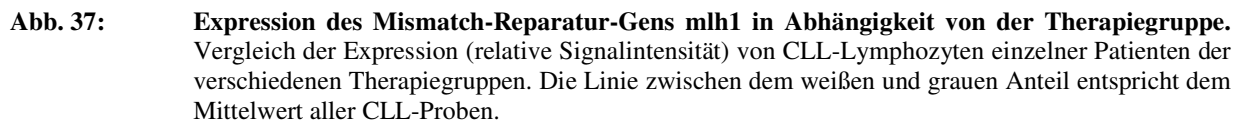
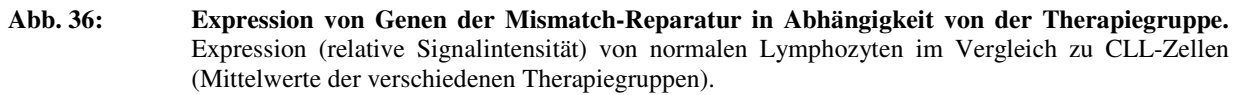


Abb. 35: Expression des Einschritt-Reparatur Gens MGMT in Abhängigkeit von der Therapiegruppe. Vergleich der Expression (relative Signalintensität) von CLL-Lymphozyten der verschiedenen Therapiegruppen. Box: 25-75% Quartile, Whisker: Spannweite, Linie innerhalb der Box: Median.

Mismatch-Reparatur

Während die meisten Expressionswerte der an der Mismatch-Reparatur beteiligten Gene relativ gering sind und sich zwischen den verschiedenen Therapiegruppen nicht wesentlich unterscheiden (Abb. 36), ist jedoch die Expression von mlh1 auffällig. So sind die Mittelwerte bei Proben von Patienten ohne Therapie, sowie von resistenten Patienten im Gegensatz zu gesunden Probanden erhöht, während die sensitive und die Fludarabin-Gruppe erniedrigte Expressionen zeigt. Bei genauerer Betrachtung der individuellen Expressionen wird deutlich, dass der Mittelwert sehr stark von einzelnen Proben mit hoher Expression bestimmt wird, da die meisten Proben nur eine geringe Signalintensität aufweisen (Abb. 37).



Des weiteren scheint die Expression von msh6 bedeutungsvoll für die Resistenzentwicklung zu sein, da dieses Gen als einziges in der resistenten Gruppe einen signifikant höheren Mittelwert aufweist ($p < 0,005$) (Abb. 38) und zudem in normalen Lymphozyten nur minimal exprimiert wird.

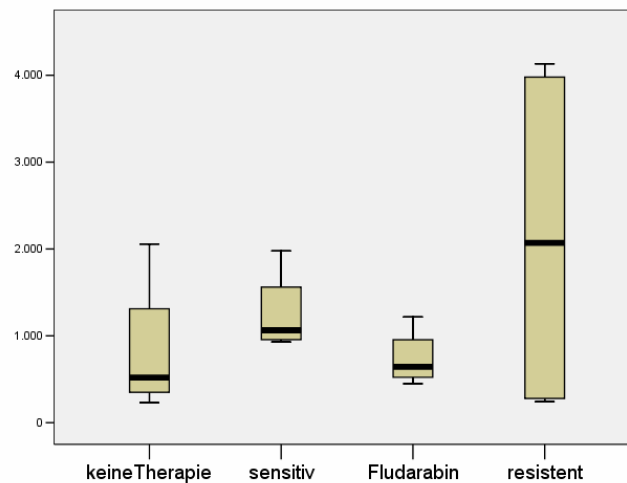


Abb. 38: Expression des Mismatch-Reparatur-Gens msh6 in Abhängigkeit von der Therapiegruppe. Vergleich der Expression (relative Signalintensität) von CLL-Lymphozyten der verschiedenen Therapiegruppen. Box: 25-75% Quartile, Whisker: Spannweite, Linie innerhalb der Box: Median.

4. Diskussion

Neben Operation und Bestrahlung stellt die Chemotherapie eine wichtige Säule in der Behandlung maligner Erkrankungen da. Das größte klinische Problem ist dabei die Entwicklung von Resistenzen gegen die unterschiedlichen Chemotherapeutika. Dafür gibt es eine Reihe von Ursachen denen zelluläre, systemische oder pharmakokinetische Mechanismen zugrunde liegen können.

Bei den verwendeten Agenzien handelt es sich abgesehen von den neuen Therapieansätzen auf der Basis monoklonaler Antikörper oder Proteinkinase-Inhibitoren, überwiegend um Substanzen, die mit der DNA der Zielzellen interagieren und zu deren Schädigung führen. Durch die unterschiedlichen Substanzklassen der Chemotherapeutika wird dabei ein breites Spektrum unterschiedlicher DNA-Läsionen erzeugt. In proliferierenden Zellen wird dann normalerweise ein Zellzyklus-Arrest eingeleitet mit dem anschließenden Versuch, die Schäden zu reparieren. Alternativ erfolgt der Zelluntergang durch Apoptose. Dadurch wird das Überleben von Zellen mit beschädigter DNA vermieden. Kommt es allerdings zu Fehlern in diesem Ablauf, z.B. bedingt durch eine mangelhafte DNA-Reparatur oder Signaltransduktion, entstehen Mutationen oder eine genomische Instabilität bedingt durch das Auftreten von Chromosomen-Aberrationen (Norbury et al., 2004; Richardson et al., 2000). Solche existenzfähigen Zellen, die noch proliferieren können, aber eine beschädigte DNA aufweisen, tragen entscheidend zur Tumorgenese oder zur Resistenzentwicklung bei (Abb. 39).

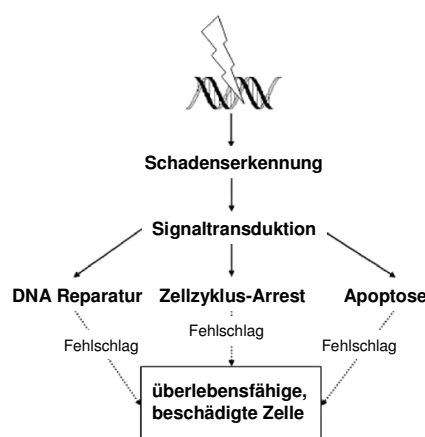


Abb. 39: „Damage response network“. Die Schadenserkennung und Signaltransduktion sind Mechanismen, die gemeinsam der DNA-Reparatur, der Zellzyklus-Kontrolle oder der Apoptose vorausgehen. Die Konsequenz einer DNA-Schädigung ist Zelltyp-spezifisch. Sind diese Prozesse fehlerhaft, so überlebt und proliferiert die Zelle mit beschädigter DNA und kann so zur Resistenzentwicklung oder Tumorentstehung beitragen. (nach Norbury et al., 2004)

Zur Untersuchung der Frage, ob das DNA-Reparatursystem einer Tumorzelle eine Rolle bei der Resistenzentwicklung spielt, wurde in dieser Arbeit die chronisch lymphatische Leukämie (CLL) als Modell gewählt. Sie ist die häufigste Leukämie im Erwachsenenalter in Europa und den USA. Entscheidende Vorteile für experimentelle Untersuchungen bietet dieses Krankheitsbild vor allem durch die gute Zugänglichkeit der malignen Zellen aus dem peripheren Blut, sowie die gut etablierten Zellmarker und die Verfügbarkeit ausgereifter Isolierungstechniken.

Im Laufe der antineoplastischen Therapie kommt es bei allen Patienten, bei einem meist sehr langsamen Krankheitsverlauf, früher oder später zum Auftreten von Resistenzen. Diese erschweren eine weitere effektive Behandlung dieser Erkrankung und erfordern den Einsatz anderer Medikamente (Foon et al., 1990).

Da es bei dieser Erkrankung nicht zu einer gesteigerten Proliferation, sondern zu einer verlängerten Lebensdauer der von malignen Stammzellen ausgehenden B-Lymphozyten kommt, befinden sich diese überwiegend in der G_1/G_0 -Phase des Zellzyklus (Reed, 1998). Das erleichtert die Analyse von DNA-Reparaturprozessen erheblich, da es nicht zur Überlagerung mit Replikationsmechanismen und proliferationsbedingten Veränderungen kommt. Deshalb spielen bei dieser Erkrankung die Regulation der Zellzykluskontrolle und DNA-Reparaturwege, die hauptsächlich während der DNA-Replikation aktiv sind, eine eher untergeordnete Rolle.

Die therapeutischen Maßnahmen richten sich daher primär auf die Induktion der Apoptose bei G_1/G_0 -Zellen und nicht auf eine Reduktion der proliferativen Zellen. Daher werden zur Chemotherapie Medikamente benötigt, die die gesamte Tumorzellpopulation, unabhängig von der DNA-Replikation, angreifen.

Die konventionelle Therapie ist nicht kurativ und normalerweise werden Patienten nur behandelt, wenn die Krankheit symptomatisch wird oder schnell progredient ist. Die Richtlinien zur Behandlung wurden 1996 von der „National Cancer Institute Working Group“ festgelegt (Cheson, 1996).

Auch wenn die neuen Therapieoptionen eine erhöhte Rate und verlängerte Dauer der Remissionen aufweisen, so konnte bisher für die meisten Medikamente kein Überlebensvorteil in randomisierten, kontrollierten Studien festgestellt werden. Dies liegt vor allem daran, dass die Progression oder das Auftreten von Symptomen nicht immer mit der Überlebenszeit korreliert. Durch diese hohe Komplexität werden Interpretation

und Vergleiche der verschiedenen Therapieregime stark erschwert. Letztlich werden alle Patienten Therapie-resistent (Schriever et al., 2003). Diese limitierten Optionen bei der Therapie sind für Ärzte und Patienten frustrierend, so dass die Entwicklung neuer Medikamente für eine Verbesserung der Remission- bzw. Überlebenszeit notwendig ist. Dafür ist ein Verständnis der Resistenzentwicklung notwendig, um neue Angriffspunkte für Medikamente zu identifizieren.

Um diese adaptiven Resistenzen zu überwinden, scheint eine Kombination von Substanzen mit unterschiedlichen Angriffspunkten sinnvoll. So konnte ein synergistischer Mechanismus von einer Kombination aus Fludarabin mit Oxaliplatin (Moufarij et al., 2006) und Fludarabin mit Cyclophosphamid gezeigt werden (Bellosillo et al., 1999).

Für die Planung und den Erfolg einer (Kombinations-)Chemotherapie, könnten die genauen Kenntnisse der jeweiligen Kapazität der einzelnen DNA-Reparaturwege wichtige Hinweise liefern. In Zukunft könnten Medikamente *in vitro* mit Lymphozyten von CLL-Patienten getestet werden, um individuell die am besten wirksamen Medikamente und Dosierungen zu ermitteln. So könnten bessere Ansprechraten erreicht und frustrierte Therapieversuche vermieden werden.

4.1 Eine Vielzahl von Einflussfaktoren erschwert die Bestimmung der DNA-Reparaturkapazität

Zur Bestimmung der Effektivität der DNA-Reparatur in Zellen gibt es verschiedene Möglichkeiten. Einerseits lässt sich mit geeigneten Nachweismethoden (wie z.B. spezifischen Antikörpern) messen, wie schnell bestimmte Schäden aus der DNA eliminiert werden. Zum anderen kann die Aktivität und Konzentration von Proteinen des DNA-Reparaturnetzwerks direkt bestimmt werden. Aufgrund der hohen Zahl beteiligter Proteine ist vorher jedoch eine Identifizierung von Schlüsselproteinen notwendig, da bisher nicht bekannt ist, welche Einzelkomponenten die Geschwindigkeit der DNA-Reparatur maßgeblich bestimmen.

Da Multiplex-Analysen auf Proteinebene technisch nach wie vor sehr schwierig durchzuführen sind und in der Regel nur begrenzt quantitative Aussagen zulassen, bieten sich für einen ersten Überblick über komplexe Funktionsnetzwerke

Genexpressionsanalysen mittels Microarrays an. Hierbei kann eine große Zahl von Genen gleichzeitig untersucht werden, um interessante Ziele zu identifizieren.

Die Genexpressionsprofile lassen allerdings keinen Rückschluss auf die Aktivität, Phosphorylierung, Lebensdauer, Konzentration, intrazelluläre Lokalisation oder den Abbau der Proteine zu. Auch post-transkriptionelle Modifikationen oder die Stabilität der mRNA, die einen großen Einfluss darauf hat, wie viele Protein-Kopien von einer mRNA abgelesen werden, können mittels Microarray nicht beurteilt werden.

Ein weiteres Problem können Punktmutationen oder Sequenzpolymorphismen in einem analysierten Gen darstellen, wenn sie das kodierte Protein in seiner Funktionsfähigkeit stark verändern. Problematisch wird dies, wenn die minimal veränderte Gensequenz nicht zu einer Störung der Hybridisierung auf dem Microarray führt und so die Expression eines funktionsfähigen Proteins vortäuscht. Andererseits wird in Einzelfällen durch die Mutation eine effektive Hybridisierung verhindert, obwohl das Protein funktionsfähig bleibt.

Durch die Kombination der verschiedenen Methoden scheint eine Identifizierung von Schlüsselenzymen, die die DNA-Reparaturkapazität und damit die Chemotherapie-Resistenz maßgeblich beeinflussen, am ehesten möglich.

4.2 Neben der DNA-Reparaturkapazität können auch andere Ursachen zur Chemotherapie-Resistenz von Leukämie-Zellen beitragen

Die Ursachen der Resistenzentwicklung gegenüber Chemotherapeutika werden nach wie vor kontrovers diskutiert. Es bestehen die Möglichkeiten des veränderten Transports (Bank et al., 1989; Panasci et al., 1988), einer veränderten Pharmakokinetik der Chemotherapeutika (Parsons et al., 1981 & 1984), der zytoplasmatischen Metabolisierung der Medikamente (z.B. wie GSH/GST) (Ribrag et al., 1996; Schisselbauer et al., 1990) und Beeinflussung durch das Ubiquitin / Proteasom System (Delic et al., 1993; Hershko et al., 1998). Im Hinblick auf die CLL hat sich für diese Parameter bisher jedoch kein großer Einfluss auf die Resistenzentwicklung abgezeichnet.

Eine Änderung der Aktivität von mit der Apoptose assoziierten Proteinen wie Bcl-X und das Bcl2 : bax-Verhältnis konnten als Faktoren der Chemoresistenz identifiziert werden (Pepper et al., 1996 & 1999; Reed, 1998). In einer Studie der „Eastern Cooperative

Oncology Group“ konnte jedoch keine Korrelation zwischen *in vitro* Chemosensitivität gegenüber Fludarabin und Regulationsproteinen der Apoptose (Bcl-2, Bax, Mcl-1, Bak, Bag-1, Caspase 3) bei CLL-Patienten gefunden werden (Kitada et al., 1998). Auch von anderen Arbeitsgruppen konnte dieser Zusammenhang nicht bestätigt werden (Christodoulopoulos et al., 1997; Johnston et al., 1997). Daher bleibt der Stellenwert der an der Apoptose beteiligten Proteine weiterhin unklar.

Eine Ausnahme bilden die 10-15 % der CLL-Patienten mit p53-Mutationen in den Tumorzellen, bei denen überwiegend eine Chlorambucil-Resistenz besteht (Begleiter et al., 1996; el Rouby et al., 1993; Johnston et al., 1997; Morabito et al., 1997; Wattel et al., 1994). Hierbei handelt es sich aber überwiegend um eine initiale Resistenz deren Ursache unklar ist. Bei der Resistenzentwicklung hingegen spielen p53 Mutationen anscheinend keine große Rolle (Christodoulopoulos et al., 1997).

Demgegenüber häufen sich die Anzeichen, dass eine erhöhte DNA-Reparaturkapazität einen entscheidenden Faktor für die Resistenzentwicklung von CLL-Zellen darstellt.

Bereits vor 30 Jahren wurde das Phänomen der Anpassung nach Schädigung durch Alkylanzien bei Bakterien beobachtet. Der biochemische Mechanismus der Adaptation ließ sich dabei auf die Regulation und Kapazität der DNA-Reparatur zurückführen (Eversen et al., 1982; Jeggo et al., 1978; Karran et al., 1982). Gegenüber DNA-reaktiven Substanzen kam es sowohl bei Zelllinien als auch bei transgenen oder „knock-out“ Mäusen zu Veränderungen der Chemosensitivität durch Modifikationen der verschiedenen DNA-Reparaturwege (Kawate et al., 1998; McWhir et al., 1993; Selfridge et al., 1982; Sobol et al., 1996). Mittlerweile ist eine erhöhte DNA-Reparaturkapazität auch für CLL-Zellen beschrieben (Deranio et al., 2005).

Chlorambucil bildet durch eine Reaktion mit zellulären Makromolekülen Protein-Protein- oder Protein-DNA-Vernetzungen. Hauptsächlich interagiert es dabei mit den Guanidin-Resten der DNA und bildet so Purin-Addukt-Komplexe (Bank et al., 1989). Außerdem können Intrastrang- und Interstrang-Vernetzungen durch kovalente Bindung an N7 des Guanins gebildet werden (Lawley et al., 1967). Vor allem diese Quervernetzungen haben ein hohes zytotoxisches Potential, da sie eine Trennung der DNA-Stränge verhindern. Dadurch werden essentielle zelluläre Prozesse wie die Transkription oder Replikation der DNA verhindert.

Durch die verschiedenen Addukte kommt es zu einer Beteiligung unterschiedlicher Reparaturwege. So konnte durch eine gesteigerte Reparaturleistung der NER (Buschfort et al., 1997; Geleziunas et al., 1991), der Einschnitt-Reparatur via MGMT (Kaina et al., 2007) und des NHEJ (Deranio et al., 2005) eine Resistenzentwicklung beobachtet werden.

Daher erfolgt in dieser Arbeit eine Konzentration auf die Betrachtung der verschiedenen DNA-Reparatursysteme, mit deren Hilfe die malignen Zellen die durch Chemotherapeutika induzierten DNA-Schäden effektiver entfernen können.

4.3 Funktionelle Untersuchungen zeigen eine parallele Nutzung unterschiedlicher DNA-Reparaturwege zur Schadensprozessierung

Ältere Analyseverfahren wie z.B. ³²P-Post-Labeling modifizierter Nukleotide (Randerath et al., 1989), Immuno-Slot-Blot Verfahren (Nehls & Rajewsky, 1982) oder die Pulsfeld-Gelelektrophorese (Southern et al., 1987) benötigen eine zu hohe Zellzahlen oder weisen eine zu geringe Empfindlichkeit auf. Der immunzytologische Assay (Adamkiewicz et al., 1985; Engelbergs et al., 1998; Seiler et al., 1993) hingegen ist in der Lage, spezifische DNA-Alkylierungsprodukte im Kern individueller Zellen zu erkennen.

Da die meisten der sich im klinischen Einsatz befindlichen Chemotherapeutika wie z.B. Chlorambucil (Bank et al., 1989; Lawley et al., 1967) keine geeigneten Antikörper für eine Immunanalytik zur Verfügung stehen, andererseits bei experimentellen Substanzen wie EtNU ein breites Addukt-Spektrum abgedeckt werden soll, scheint der Einsatz des „Comet Assay“ (Singh et al., 1988; Tice et al., 2000) die effektivste Methode zur Beurteilung der zellulären DNA-Reparaturkapazität.

Mit dieser Methode ist es möglich DNA-Strangbrüche zu messen, die in chemisch modifizierten DNA-Sequenzen entweder spontan auftreten oder mit der Exzisions-Reparatur unterschiedlicher Schadenstypen assoziiert sind. Da die Alkylierung der DNA z.B. durch EtNU bei allen Proben gleich schnell abläuft, wird durch die unterschiedliche Kinetik der Inzisions-Prozesse die individuelle zelluläre DNA-Reparaturkapazität widerspiegelt.

Nicht entfernte DNA-Addukte können ebenso wie durch Reparaturenzyme hervorgerufene persistierende DNA-Einschnitte zur Aktivierung apoptotischer Signalkaskaden führen. Für eine Bewertung der Reparaturleistung einer Zelle sind daher sowohl die initiale Anzahl der DNA-Einschnitte als auch die Dauer der Reparatur dieser Inzisionen wichtig.

Welche Proteine für die großen individuellen Unterschiede bei der Beseitigung von DNA-Schäden und für die Resistenzentwicklung von malignen Zellen verantwortlich sind, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Viele Expressionsanalysen beschränken sich auf Untersuchungen an Zelllinien oder an Mausmodellen, während Untersuchungen an primärem, klinischem Tumormaterial weniger häufig durchgeführt wurden und oft widersprüchliche Ergebnisse zeigten.

Diese kontroversen Resultate werden erst mit den wachsenden Kenntnissen über das funktionelle Zusammenspiel innerhalb des „damage response network“ verständlicher. So ist bei der DNA-Reparatur von Alkylierungsschäden beispielsweise nicht nur ein einzelner Mechanismus beteiligt, sondern ein komplexes Netzwerk verschiedener Prozesse die ineinander greifen. Zusätzlich zu den verschiedenen DNA-Reparaturwegen besteht darüber hinaus ein enger Kontakt zur Zellzykluskontrolle und zu Proteinen, die in der Regulation der Apoptose eine Schlüsselrolle spielen.

Das Ausmaß einer parallelen Nutzung von verschiedenen Reparaturwegen für einen Schadenstyp wurde bisher wenig untersucht. Die hier durchgeführten funktionellen Untersuchungen zeigen eine gleichzeitige Beteiligung verschiedener Reparaturwege (Abb. 16), die individuell sowohl in der gesamten Aktivität als auch in der prozentualen Beteiligung der einzelnen Reparaturwege große Unterschiede zeigen. Dabei ist nach wie vor unklar, ob für die gleiche Läsion wirklich eine parallele Nutzung vorliegt, oder ob erst bei nicht mehr ausreichender Kapazität eines Reparaturweges ein alternativer Weg beschritten wird.

4.4 Genexpressionsanalysen identifizieren mögliche Schlüsselenzyme der DNA-Reparatur die entscheidend zur Resistenzentwicklung gegenüber Chemotherapeutika beitragen

Die in den Cluster-Analysen gezeigte fehlende Korrelation zwischen dem Expressionsmuster der DNA-Reparaturgene bei CLL-Lymphozyten und dem Resistenzphänotyp hat eine Vielzahl von möglichen Ursachen. Neben den bereits erwähnten verschiedenen Möglichkeiten der klinischen Resistenzentwicklung gibt es bei der Microarray-Analyse eine Reihe von Fehlerquellen. So kann das Arrangement der Oligonukleotide auf dem Microarray ebenso einen Einfluss auf die Analyse und Normalisierung haben (Yang et al., 2002), wie die Technik, mit der die Oligonukleotide auf die Microarray-Matrix aufgetragen wurden (Skena et al., 1995; Shalon et al., 1996), oder Verunreinigungen der für die Produktion verwendeten Klone (Halgren et al., 2001).

Daneben gibt es von der Produktion unabhängige Fehlerquellen (Churchill, 2002):

- a.) fehlerhafte Messung der Fluoreszenzsignale
- b.) technisch bedingte Variationen (Extraktion, Markierung, Hybridisierung)
- c.) natürliche Variabilität des biologischen Systems

Daher wurden Microarrays mit Duplikaten der Oligonukleotide verwendet, um die Präzision zu erhöhen (Lee et al., 2000). Technisch bedingte Variationen wurden durch wiederholte Untersuchungen von Zell-Aliquots eines Patienten minimiert. Dabei stellte sich die biologische Variabilität als das größte Problem heraus. Um statistische Signifikanz zu erreichen, wurde eine möglichst große Anzahl von Patienten (n= 49) untersucht (Rosenbaum, 2001).

Die Korrelation zwischen der Rate der Intensität von Oligonukleotid-Duplikaten auf einem einzelnen Microarray liegt typischerweise über 95 %. Dies wird oft als Demonstration der Reproduzierbarkeit von Expressionsdaten interpretiert. Wenn man aber die mRNA einer Probe aufteilt und auf zwei unterschiedlichen Microarrays hybridisiert, so fällt die Korrelation zwischen diesen Hybridisierungen meist auf 60-80%, oder zum Teil noch stärker, wenn zusätzlich der Markierungsfarbstoff vertauscht wird (Churchill, 2002).

Zusätzlich zu diesen spezifischen Problemen des Microarray, ist durch eine unterschiedliche Beteiligung der verschiedenen Reparaturwege eine sehr individuelle

Zusammensetzung der provozierten Reparaturantwort möglich. So liegt der Anteil der BER an der DNA-Reparatur von EtNU-Addukten bei individuellen Zellproben zwischen 4 und 100 % (siehe 2.3.3). Dadurch ist es möglich, dass eine differentielle Expression von spezifischen DNA-Reparaturwegen, die eine Resistenzentwicklung bedingen, bei Betrachtung von mittleren Expressionen aufgrund der hohen individuellen Varianz als nicht signifikant bewertet wird. So schwankt die Expression der Gene eines Reparaturweges selbst innerhalb einer Patientengruppe sehr stark (Abb. 28). Wenn man diese Beobachtungen berücksichtigt, konnte bei der Auswertung einzelner Proben z.T. ein positiver Zusammenhang zwischen der relativen Aktivität und der Expression mehrerer Gene mit einer Schlüsselposition in der BER festgestellt werden (Abb. 29, Tab. 4; CLL 767 - TDG - MYH - APE). Daher scheint eine individuelle Betrachtung der verschiedenen Reparaturwege und jeweiligen Schlüsselproteine notwendig.

Bei Genen, die trotz der Mittelwertbildung im Gruppenvergleich differentiell oder auffällig hoch exprimiert sind (z.B. MYH, ATM, Mre11), ist eine genauere Betrachtung besonders interessant. Hier liegt vermutlich trotz der individuellen Expressions-Unterschiede eine insgesamt für die jeweilige Therapiegruppe wichtige Abgrenzung zu anderen CLL-Therapiegruppen vor.

Diese Gene, deren Expression konform mit der funktionellen Reparaturkapazität oder mit dem klinischen Status entlang der Resistenzentwicklung reguliert werden, scheinen für eine abgestimmte Antwort auf DNA-Schäden essentiell zu sein. Damit ist von einer wichtigen regulatorischen Funktion dieser Gene im Reparatur-Netzwerk auszugehen.

Wünschenswert wäre ein direkter Vergleich zwischen den physiologischen B-Zellen und den CLL-Lymphozyten des gleichen Patienten, um individuelle Schwankungen der basalen Expressionsmuster zu identifizieren. Dies ließ sich jedoch nicht durchführen, da die Hämatopoese bei fortschreitendem Krankheitsverlauf meist so stark gestört ist, dass es nicht möglich ist, normale Lymphozyten in ausreichender Zahl und Reinheit zu isolieren. Daher erfolgt in dieser Arbeit die Expressionsanalyse an Lymphozyten gesunder Spender. Auch diese Gruppe weist individuell unterschiedliche Genexpression auf, aber die Varianz ist wesentlich geringer als bei CLL-Lymphozyten. Dieses spricht einerseits für eine sehr starke Veränderung der einzelnen Reparaturwege während der malignen Transformation, andererseits könnte dies auch ein Zeichen eines allgemeinen Kontrollverlustes in der Genexpression bei malignen Zellen sein.

Die Veränderungen der Genexpression im Laufe der Resistenzentwicklung werden besonders deutlich, wenn die Veränderungen eines Patienten in verschiedenen Therapiestadien miteinander verglichen werden (Abb. 40). Unabhängig von der Mittelwertbildung aller Proben, die wie beschrieben häufig die Betrachtung der Ergebnisse durch die starken Schwankungen der Expression erschwert, zeigt sich hier, welche Gene bei diesem individuellen Patienten zu einer Resistenzentwicklung beigetragen haben können.

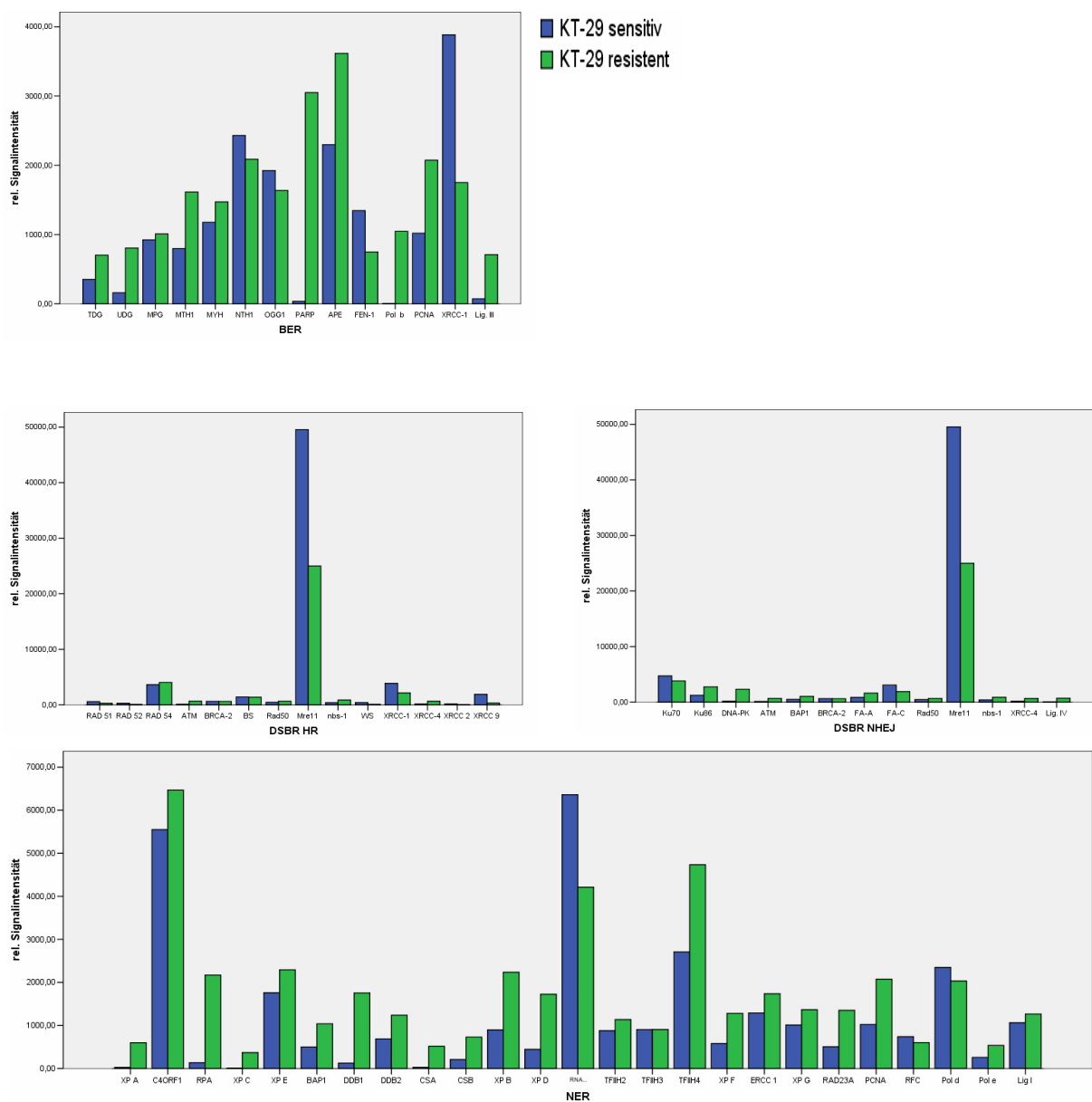


Abb. 40: Expression von Genen der DNA-Reparatur in Abhängigkeit vom Resistenz-Stadium. Expression (relative Signalintensität) von sensitiven und resistenten Lymphozyten eines Patienten im Laufe des Krankheitsverlaufs. A.) BER, B.) HR, C.) NHEJ, D.) NER.

Auch wenn sich daraus keine allgemein gültigen Aussagen ableiten lassen, ist aufgrund der Vielfalt von molekularen Veränderungen während des klinischen Verlaufs, dies eine Möglichkeit, bei einzelnen Patienten den Einfluss der DNA-Reparatur auf die Resistenzentwicklung genauer zu erforschen und daraus gegebenenfalls eine individuell angepasste Therapie abzuleiten.

4.4.1 Bedeutung der Basen-Exzisions-Reparatur für die Resistenzentwicklung

Eine strukturelle Modifikation von Basen ist die häufigste Form einer DNA-Schädigung in Zellen. Daher spielt die BER die Hauptrolle bei der Reparatur der häufigsten DNA-Schäden (Lindahl et al., 1999; Wood, 1996). Endogene metabolische Schäden wie z.B. durch oxidativen Stress oder Methylgruppen-Transfer sind die Hauptursache (Dempfle et al., 1994; Izumi et al., 2003). Allerdings können auch durch externe Belastungen wie UV-Licht, ionisierende Strahlung oder Alkylanzien entsprechende Schäden verursacht werden (Lindahl, 1993). Durch spezifische Glykosylasen wie z.B. MYH (MutY Homolog) (Parker et al., 2003) können solche Läsionen erkannt und entfernt werden (Hashimoto et al., 2004). Dadurch werden Fehlpaarungen von Basen während der DNA-Replikation vermieden und die genomische Integrität wird gewahrt (Moriya, 1993).

Von der Vielzahl der bekannten Glykosylasen zeigt dabei MYH als einzige eine differentielle Expression zwischen normalen- und CLL-Lymphozyten mit einer signifikant gesteigerten Genexpression bei CLL-Lymphozyten resistenter Patienten.

Vererbte Defekte des MYH-Gens sind mit einer Häufung von kolorektalen Tumoren vergesellschaftet (Al-Tassan et al., 2002; Jones et al., 2002). Der „Knockout“ des MYH-Gens bei Mäusen führt neben einer gesteigerten Tumorrates (Xie et al., 2004) zu gehäuft Mutationen in embryonalen Stammzellen (Hirano et al., 2003). Dies unterstreicht die enorme Bedeutung von MYH für den Erhalt der genomischen Stabilität. Weiterhin hat MYH über seine Interaktion mit dem Rad9 / Rad1 / Hus1-Proteinkomplex (9-1-1 Komplex) (Chang et al., 2005) regulativen Einfluss auf die Zellantwort nach DNA-Schäden und führt so zum Zellzyklus-Arrest oder zur Apoptose (Zhou et al., 2000).

Der 9-1-1 Komplex dient zusätzlich als Schadens-Sensor und als Komponente der BER, indem er mit weiteren Enzymen der BER wie Polymerase β (Toueille et al., 2004), FEN 1 (Flap endonuclease 1) (Friedrich-Heineken et al., 2005; Wang et al., 2004), und DNA-Ligase I (Smirnova et al., 2005; Wang et al., 2006) interagiert und diese stimuliert.

Eine Vielzahl der auftretenden Basenschäden und Fehlpaarungen während der DNA-Replikation werden unter der Beteiligung von MYH repariert (Ohtsubo et al., 2000; Takao et al., 1999; Yeh et al., 1991). Dazu liegt eine Kopplung mit PCNA vor (Parker et al., 2001), da MYH ohne die Einwirkung von PCNA nur eine geringe Glykosylase-Aktivität besitzt (Chang et al., 2002). Daher wurde bisher PCNA als wichtigstes Protein in der Koordination und Regulation der BER betrachtet (Kelman et al., 1998). Da sich die meisten CLL-Lymphozyten jedoch in der G₁/G₀-Phase des Zellzyklus befinden und keine Replikation stattfindet, scheint bei der CLL die Bedeutung von PCNA deutlich geringer zu sein. Die Regulation und Aktivierung der BER hängt damit vermutlich überwiegend von MYH und dessen Interaktion mit dem 9-1-1 Komplex ab.

Denn bei geringen PCNA Konzentrationen, wie z.B. nach einer Inaktivierung durch p21, kann während eines durch DNA-Schädigung aufgetretenen Zellzyklus-Arrestes der 9-1-1 Komplex die Rolle von PCNA übernehmen (Waga et al., 1994).

Die Glykosylase-Aktivität von MYH wird durch den 9-1-1 Komplex um das 2,5-fache gesteigert (Shi et al., 2006), während eine erhöhte MYH-Expression zu einer Phosphorylierung von Hus1 führt. Auch wenn eine Phosphorylierung nicht essentiell für die Hus1-MYH Interaktion ist, so korreliert *in vivo* die Hus1-MYH Interaktion mit dem Grad der Hus1 Phosphorylierung (Chang et al., 2005). Nach ionisierender Bestrahlung ist die Interaktion zwischen Hus1 und MYH erhöht, während nur minimale Unterschiede in der Interaktion zwischen PCNA und MYH auftreten (Shi et al., 2006). Da eine Kreuzresistenz zwischen ionisierender Bestrahlung und Chlorambucil in CLL-Lymphozyten besteht (Bentley et al., 1995), könnte MYH über seine Kopplung an den 9-1-1 Komplex wichtigen Einfluss auf die Resistenzentwicklung haben.

Aber auch wenn eine Funktionseinschränkung des MYH-Gens eine eingeschränkte DNA-Reparaturkapazität zur Folge hat, ist bisher unklar, ob eine erhöhte Genexpression wirklich eine verbesserte DNA-Reparatur bedingt.

Allerdings scheint es, aufgrund seiner multiplen regulativen Eigenschaften auf andere Proteine und seiner Rolle bei der Erkennung und initialen Prozessierung von DNA-Schäden, eine Schlüsselposition in der DNA-Reparatur einzunehmen.

Durch eine beschleunigte Exzision von DNA-Addukten kann aber, bedingt durch eine gesteigerte Glykosylase-Aktivität, eine Häufung von sekundären DNA-Strangbrüchen auftreten. Diese haben ein hohes zytotoxisches Potential und können zur Apoptose führen (Coquerelle et al., 1995; Fishel et al., 2003; Rinne et al., 2004). Um dieses zu

vermeiden, müssten die nachfolgenden Polymerisations- und Ligations-Schritte ebenfalls beschleunigt sein. Somit wäre eine erhöhte Expression der Polymerase- und Ligase-assoziierten Gene zu erwarten.

Diese Erwartungen decken sich mit den durchgeführten Genexpressionsanalysen insofern, dass DNA-Polymerase β und DNA-Ligase III im Gegensatz zu Lymphozyten gesunder Probanden eine erhöhte Expression aufweisen. Allerdings gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Therapiegruppen.

Der Bedeutung der BER für die Resistenzentwicklung wird in den funktionellen Untersuchungen deutlich, bei denen Zellen mit schnellem Reparatur-Phänotyp einen höheren Anteil der BER an der gesamten Reparaturleistung aufweisen. Bei CLL 767 (Abb. 29) kommt es zu einer stark erhöhten MYH-Expression, die mit einem hohen BER-Anteil, klinischer Resistenz und einem schnellen Reparaturphänotyp assoziiert ist.

Die *in vitro* und *in vivo* Aktivität von MYH kann außerdem von anderen Proteinen wie APE I oder MSH2 / MSH6 moduliert werden. Auf diese Weise ist die BER mit der Mismatch-Reparatur, der DNA-Replikation, der Zellzyklus-Kontrolle und Kontrollproteinen der DNA-Reparatur vernetzt (Lu et al., 2006).

4.4.2 Bedeutung der Nukleotid-Exzisions-Reparatur für die Resistenzentwicklung

Die NER wird durch Interstrang-Verknüpfungen oder unförmige („bulky“) Addukte aktiviert, wie sie von Alkylanzien oder platinierenden Substanzen hervorgerufen werden (Chaney et al., 1996). Die Daten zur Beteiligung der NER an der Resistenzentwicklung sind dabei widersprüchlich.

Während zwar, wie bei den hier vorgestellten Ergebnissen, schon zuvor eine erhöhte Genexpression der Endonuklease ERCC1 gemessen wurde (Geleziunas et al., 1991), konnte andererseits keine Erhöhung der Proteinspiegel nachgewiesen werden (Bramson et al., 1995a). Insgesamt scheint die Aktivität der NER sowohl bei den Tumorzellen unbehandelter wie auch resistenter Patienten eher gering zu sein (Barret et al., 1996). Das wurde durch die Genexpressionsanalysen weitgehend bestätigt, da kaum Unterschiede zwischen den verschiedenen Therapiegruppen bestehen und auch im Vergleich zu normalen Lymphozyten nur wenige Gene differentiell exprimiert sind.

Des Weiteren sind gegen Chlorambucil resistente CLL-Lymphozyten zwar komplett kreuzresistent gegen Melphalan und Mitomycin C und partiell kreuzresistent gegen Cisplatin, allerdings nicht kreuzresistent gegenüber UV-Licht. Da durch UV-Licht verursachte DNA-Schäden Substrate der NER sind, scheint es keine Hoch-Regulation dieses Weges in der Resistenzentwicklung gegenüber Alkylanzien zu geben (Bramson et al., 1995b).

4.4.3 Bedeutung der Doppelstrangbruch-Reparatur für die Resistenzentwicklung

Doppelstrangbrüche, die nicht repariert werden, können zur Apoptose (Rich et al., 2000), zu Mutationen oder zu einer genomischen Instabilität aufgrund nicht-letaler Chromosomen Aberrationen führen (Richardson et al., 2000) und stellen so eine der größten Gefahren für die Zelle da.

Homologe Rekombination (HR) und „non-homologous end-joining“ (NHEJ) sind die beiden wichtigsten Reparaturwege von DSB. Dabei ist NHEJ der Hauptweg zur Reparatur von DSB, die nicht mit der Replikation assoziiert sind, während DSB die an der Replikationsgabel oder in der G₂-Phase auftreten überwiegend durch HR repariert werden (Khanna et al., 2001; van Gent et al., 2001).

Da sich über 95 % der CLL Zellen in der G₁/G₀-Phase befinden (Reed, 1998), scheint die NHEJ die wichtigere Position in der Resistenzentwicklung dieser Zellen einzunehmen. So zeigen auch die Expressionsdaten keine differentiell exprimierten Gene der HR mit Ausnahme von ATM und nbs-1, die auch beim NHEJ eine wichtige Rolle spielen.

4.4.4 Bedeutung des „non-homologous end-joining“ für die Resistenzentwicklung

Da die Reparatur via NHEJ nicht, wie bei der HR, fehlerfrei abläuft, kann es bei der Reparatur zum Verlust von DNA-Sequenzen kommen. Während die Reparatur in sensitiven Zellen oft langsam abläuft, kommt es durch eine beschleunigte Reparatur bei resistenten CLL-Zellen zur Akkumulation von chromosomalen Aberrationen (Blaise et al., 2002). Besteht gleichzeitig eine Störung in der Regulation der Apoptose, kann es durch die entstehenden Mutationen und die genomische Instabilität zu einem aggressiveren Krankheitsverlauf kommen.

Die Chemosensitivität von CLL-Zellen korreliert mit der Aktivität einiger spezifischer Proteine wie z.B. der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK) *in vivo* und *in vitro* (Muller et al., 1997 & 1998). Dieser Einfluss einzelner Proteine konnte durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren wie z.B. NU7026 als DNA-PK Inhibitor untersucht werden. So konnte nachgewiesen werden, dass der NHEJ-Reparaturweg abhängig von der DNA-PK Aktivität ist. Übereinstimmend mit den hier dargestellten Ergebnissen kommt es jedoch nicht zu einer steigenden Genexpression mit zunehmender Resistenz (Deranio et al., 2005). Die Regulation erfolgt hier überwiegend durch Proteinkinasen mittels Phosphorylierung über spezifische Signaltransduktionskaskaden.

Auch DNA-Reparatur-Mutanten zeigen deutlich einen Zusammenhang zwischen der DNA-Reparatur und der Chemosensitivität. So gibt es eine Hypersensitivität gegenüber alkylierenden Substanzen bei Funktionsmutanten von XRCC-2, XRCC-3, Rad54, Ku70, Ku86 und DNA-PK (Caldecott et al., 1991; Essers et al., 1997; Hoy et al., 1985; Liu et al., 1998; Tanaka et al., 1993). Allerdings fehlen bisher Untersuchungen, ob eine gesteigerte Expression dieser Gene zu einer Chemoresistenz führen kann. Bei den durchgeführten Genexpressionsanalysen gibt es zwar bei einigen dieser Gene eine erhöhte Expression bei CLL-Lymphozyten, allerdings keinen signifikanten Unterschied zwischen den Resistenzgraden.

Dabei sind allerdings individuell starke Schwankungen der Genexpression erkennbar, so dass bei einzelnen CLL-Patienten durchaus ein Zusammenhang zur DNA-Reparaturkapazität bestehen könnte.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil des NHEJ ist der MRN-Komplex, bestehend aus Mre11, Rad50 und Nbs1. Dieser spielt eine wichtige Rolle in der Zellantwort auf DNA-Schäden. Als eines der ersten Proteine bindet der Komplex an DSB und wird für die Aktivierung der ATM-abhängigen Signaltransduktion und DNA-Reparatur benötigt (Stracker et al., 2004). Die enorme Bedeutung wird ersichtlich, wenn man sich Mutationen dieser Gene anschaut. Schon die Null-Mutation bei einem dieser Gene führt zur embryonalen Letalität bei Mäusen (Luo et al., 1999; Xiao et al., 1997; Zhu et al., 2001). Beim Menschen führt ein Ausfall zur „Ataxia telangiectasia-like Disorder“ (ATLD) (Stewart et al., 1999). Dies legt nahe, dass ATM und Mre11 im selben DNA-Reparaturweg eng aneinander gekoppelt tätig sind und notwendig sind, um eine Akkumulation von DSB zu vermeiden (Costanzo et al., 2001; Stewart et al., 1999). Darüber hinaus hat der MRN-Komplex noch weitere Aufgaben. Bisher wurde

angenommen, dass die beiden Reparaturwege bei DSB voneinander klar getrennt werden können (D'Amours et al., 2002; Paques et al., 1999). Jedoch zeigen neuere Erkenntnisse, dass HR und NHEJ kooperieren können (Allen et al., 2002 & 2003) und der MRN-Komplex für die Wahl des Reparaturweges maßgeblich verantwortlich ist (Yang et al., 2006). So werden Störungen der einzelnen Reparaturwege untereinander vermieden. Gleichzeitig bildet dies die Grundlage für eine Verknüpfung und Koordination von Schadenserkennung, der zellulären Signalantwort auf den Schaden, den für eine Bindung an die Schadensstelle notwendigen Umbau des Chromatins und der enzymatischen Reparaturwege.

Dabei ist die Zellantwort dynamisch durch Wechselbeziehungen mit dem MRN-Komplex verknüpft und abhängig von Interaktionen, Phosphorylierungen und der Konformation der beteiligten Proteine (Hopfner et al., 2002a & 2002b; Moreno-Herrero et al., 2005).

Aufgrund dieser vielen Einflussfaktoren lassen sich trotz der hohen Genexpression von Mre11 keine direkten Schlüsse auf die Resistenzentwicklung ableiten, v.a. da die individuelle Expression innerhalb aller Therapiegruppen außerordentlich stark schwankt (Abb. 31b).

Die Rolle des MRN-Komplex in der Tumorgenese wird zunehmend klarer (Carney et al., 1998; Varon et al., 1998), aber der Einfluss unterschiedlicher Aktivität dieses Komplexes auf eine Chemoresistenz ist bei der aktuellen Datenlage nicht eindeutig zu bewerten. Die Genexpression einzelner Komponenten des MRN-Komplex scheint dabei nicht das ausschlaggebende Kriterium für die Funktion zu sein, sondern eher Modifikationen der Konformation, die Phosphorylierung, sowie die Interaktion mit den anderen an der DNA-Reparatur und der Zellzykluskontrolle beteiligten Proteine. Aus einer direkten Blockade von Proteinen des MRN-Komplex und einer daraus resultierenden Beeinträchtigung der DNA-Reparatur könnten sich neue Therapieoptionen ableiten lassen, allerdings sind die Nebenwirkungen einer solchen Therapie aufgrund der Verflechtung mit vielen Signaltransduktionskaskaden bisher nicht absehbar.

4.4.5 Die Expression des ATM-Gens ist in resistenten CLL-Lymphozyten erhöht

Eine Inaktivierung des „ataxia telangiectasia mutated“ (ATM)-Gens spielt eine wichtige Rolle in der lymphatischen Tumorgenese. Dies wird durch die Assoziation zwischen Mutationen des ATM-Gens und der hohen Inzidenz von lymphatischen Neoplasien bei Patienten mit AT und mit der Entwicklung von Lymphomen in ATM-defizienten Mäusen

deutlich. So ist das ATM-Gen in 18% der CLL-Patienten in den Tumorzellen mutiert und ein Verlust der Heterozygotie tritt in 14 % der Fälle auf (Bullrich et al., 1999). Diese Mutationen führen in den meisten Fällen zu einem deutlichen Absinken des ATM-Proteinspiegels (Starostik et al., 1998). Allerdings ist trotz der gehäuft auftretenden sporadischen ATM-Mutationen bei CLL-Patienten der Zusammenhang zwischen ATM-Inaktivierung und der Pathogenese der CLL weiterhin unklar (Pettitt et al., 2001; Schaffner et al., 1999; Stankovic et al., 1999).

ATM existiert als inaktives Dimer oder Multimer in unbeschädigten Zellen. Nach einer DNA-Schädigung (z.B. durch Bestrahlung) kommt es zur Aktivierung der Kinase, Dissoziation der Dimere und einer Autophosphorylierung (Bakkenist et al., 2003). Vom ATM-Protein wird angenommen, dass es in verschiedenen biochemischen Wegen eine Rolle spielt und dabei die Erkennung und Reparatur von DSB mit anderen zellulären Prozessen, wie der Zellzyklus-Kontrolle und dem programmierten Zelltod vernetzt (Shiloh, 1997). Eins der bedeutsamsten Charakteristika von ATM-defizienten Zellen ist die hohe Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung. Dabei erfolgt die so induzierte Apoptose in Abhängigkeit von p53 (Meyn, 1995).

ATM wird hierbei als Zellantwort auf einen DSB aktiviert und führt u.a. zu einer durch Phosphorylierung hervorgerufenen Aktivitätssteigerung von p53 (Abb. 41). Zusammen mit p53 hat ATM also Einfluss auf die Regulation der DNA-Reparatur, die Zellzyklus-Kontrolle, die Apoptose und die zelluläre Proliferation. Dabei gilt ATM als Wächter des Genoms (Savitsky et al., 1995; Zakian, 1995).

In Zusammenhang mit ATM-defizienten CLL-Zellen tritt häufig ein besonders aggressiver Krankheitsverlauf auf (Starostik et al., 1998). Die genauen Ursachen sind noch unklar. Wahrscheinlich akkumulieren diese Zellen, im Vergleich zu normalen Lymphozyten oder CLL-Lymphozyten ohne ATM-Mutation, viele unreparierte chromosomale Aberrationen nach einer DNA-Schädigung an (Stankovic et al., 2002). Dies entspricht also einer Hypersensitivität gegenüber DSB-induzierenden Agenzien, aufgrund einer eingeschränkten Reparaturfähigkeit (Levis et al., 1979; Metcalfe et al., 1996; Taylor et al., 1996). Diese korreliert mit einer fehlenden Hoch-Regulation von p53, welche normalerweise nach einer DNA-Schädigung durch ATM induziert wird. Daraus könnte letztlich eine Abschwächung der von p53 abhängigen Apoptose und so trotz der Hypersensitivität gegenüber DSB ein gegenüber Chemotherapie refraktärer Phänotyp resultieren (Hawly et al., 1996; Xu et al., 1996).

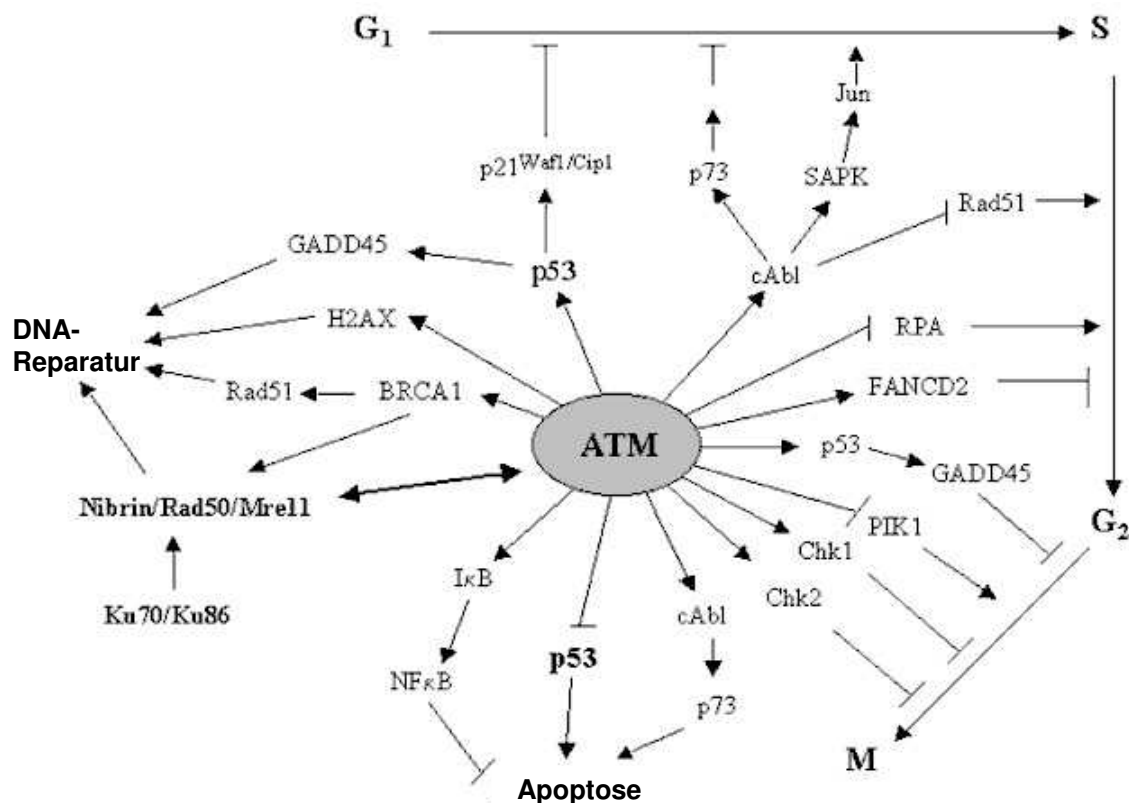


Abb. 41: Nach einem DNA-DSB interagiert ATM mit vielen verschiedenen Proteinen, um einen Zellzyklus-Arrest zu induzieren, die DNA-Reparatur zu verstärken oder die Apoptose zu inhibieren. (nach Uhrhammer et al. 2002)

Im Gegensatz zu einer Untersuchung von Starostik et al. (Starostik et al., 1998), die bei 34 % der CLL-Patienten einen um mindestens 50 % (im Vergleich zu normalen Lymphozyten) erniedrigten ATM Proteinspiegel fanden, ist bei der hier durchgeführten Microarray-Analyse die Genexpression von ATM in CLL-Zellen durchgehend erhöht. Signifikant ist dieses Ergebnis jedoch nur in der resistenten Therapiegruppe. Aufgrund der vielfach beschriebenen kürzeren Überlebenszeit bei ATM-defizienten Patienten, könnte eine Selektion stattgefunden haben, so dass sich in der resistenten Gruppe weniger Patienten mit einer Mutation des ATM-Gens befinden. Dies könnte die höhere Expression in dieser Gruppe erklären. Bisher konnte noch kein objektiver klinischer Parameter gefunden werden, der die schlechte Prognose erklären kann. Auch fehlen aussagekräftige Untersuchungen, die ATM-Mutationen in Hinblick auf die Therapieresistenz und DNA-Reparaturkapazität geprüft haben, da beide Parameter nicht aus einer einfachen Betrachtung der Überlebenszeit abzuleiten sind.

Auf eine erhöhte DNA-Reparaturkapazität bei hoher ATM-Expression und einer daraus resultierenden Therapieresistenz deutet eine Untersuchung an 10 resistenten CLL-Patienten hin, bei denen weder ein Verlust des ATM Gens noch eine Mutation von p53 vorlagen (Blaise et al., 2001). Für eine Rolle in der Resistenzentwicklung spricht weiterhin, dass nach ionisierender Bestrahlung eine Aktivitätserhöhung der ATM-Kinase um das 2,5-fache erfolgt (Canman et al., 1998; Pandita et al., 2000; Rotman et al., 1999).

Auch der bereits erwähnte MRN-Komplex hat einen modifizierenden Einfluss auf die Aktivität der ATM-Kinase. Bei einem Ausfall des Komplexes kommt es zu einer Verminderung der ATM-Aktivität (Mochan et al., 2003). Dies führt über eine Reduktion der DNA-Reparaturkapazität zur bereits erwähnten ATLD.

5. Zusammenfassung

Der Verlust der Sensitivität von Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika stellt klinisch nach wie vor das größte Problem bei der Behandlung maligner Erkrankungen da. In dieser Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss DNA-Reparaturprozesse auf die Entwicklung einer Resistenz der Tumorzellen gegenüber DNA-reaktiven Substanzen haben.

Ein Modell der Chemotherapie-Resistenz mit direktem Bezug zur klinischen Therapie stellt die chronisch lymphatische Leukämie (CLL) dar. Die Standardbehandlung mit alkylierenden Medikamenten wie z.B. Chlorambucil ist mit einer geringen Rate an kompletten Remissionen verknüpft. Die Fähigkeit der CLL-Zellen, Alkylierungsschäden der DNA durch eine Reparatur effektiv zu eliminieren, könnte den mangelnden Therapieerfolg erklären.

Die systematische Untersuchung von normalen und CLL-Lymphozyten zeigte in funktionellen Tests nach einer Exposition gegenüber DNA-schädigenden Substanzen eine geringe interzelluläre aber eine hohe individuelle Varianz der DNA-Reparaturkapazität. Die CLL-Zellen mit einer erhöhten Therapieresistenz zeigten eine schnellere DNA-Reparatur in den funktionellen Untersuchungen, ließen sich jedoch nicht anhand spezieller Expressionsmuster in den Clusteranalysen identifizieren. So konnte die erhöhte DNA-Reparaturkapazität dieser Zellen nicht auf eine differentielle Genexpression einzelner DNA-Reparaturwege zurückgeführt werden. Die extremen Unterschiede, sowohl in der individuellen Reparaturkapazität als auch in der relativen Nutzung der einzelnen Reparaturwege, deuten auf einen Verlust der Regulation des komplexen Reparaturnetzwerks hin. Allerdings korreliert die erhöhte Expression einzelner Gene (z.B. ATM, Mlh6, MYH) mit der klinischen Therapieresistenz.

Die in dieser Arbeit beschriebene Relevanz einzelner Gene könnte auf neue Angriffspunkte zur Überwindung einer Resistenz hindeuten. Auch könnte aufgrund der großen individuellen Unterschiede, sowohl der funktionellen Reparaturkapazität als auch der Genexpression, eine *in vitro* Testung von CLL-Zellen zu einer individualisierten Therapie jedes Patienten führen. So wäre es möglich Dosierungen und Medikamente für jeden Patienten (ähnlich einem Antibiogramm) individuell zu ermitteln, um durch eine gezielte statt einer kalkulierten Therapie frustrane Therapieversuche zu vermeiden.

6. Literaturnachweis

01.) Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, Järvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, et al. (1993) Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*. 260(5109),812-6.

02.) Abraham RT. (2001) Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev*. 15(17),2177-96.

03.) Adamkiewicz J, Eberle G, Huh N, Nehls P, Rajewsky MF. (1985) Quantitation and visualization of alkyl deoxynucleosides in the DNA of mammalian cells by monoclonal antibodies. *Environ Health Perspect*. 62,49-55.

04.) Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, et al. (2000) Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 403(6769),503-11.

05.) Allen C, Kurimasa A, Brenneman MA, Chen DJ, Nickoloff JA. (2002) DNA-dependent protein kinase suppresses double-strand break-induced and spontaneous homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(6),3758-63.

05.) Allen C, Halbrook J, Nickoloff JA. (2003) Interactive competition between homologous recombination and non-homologous end joining. *Mol Cancer Res*. 1(12),913-20.

06.) Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, Fleming N, Livingston AL, Williams GT, Hodges AK, Davies DR, David SS, Sampson JR, Cheadle JP. (2002) Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet*. 30(2),227-32.

07.) Andressoo JO, Hoeijmakers JH. (2005) Transcription-coupled repair and premature ageing. *Mutat Res*. 577(1-2),179-94.

08.) Baer JC, Freeman AA, Newlands ES, Watson AJ, Rafferty JA, Margison GP. (1993) Depletion of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase correlates with potentiation of temozolomide and CCNU toxicity in human tumour cells. *Br J Cancer*. 67(6),1299-302.

09.) Bakkenist CJ, Kastan MB. (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*. 421(6922),499-506.

10.) Bank BB, Kanganis D, Liebes LF, Silber R. (1989) Chlorambucil pharmacokinetics and DNA binding in chronic lymphocytic leukemia lymphocytes. *Cancer Res*. 49(3),554-9.

11.) Barret JM, Calsou P, Laurent G, Salles B. (1996) DNA repair activity in protein extracts of fresh human malignant lymphoid cells. *Mol Pharmacol*. 49(5),766-71.

12.) Barret JM, Hill BT. (1998) DNA repair mechanisms associated with cellular resistance to antitumor drugs: potential novel targets. *Anticancer Drugs*. 9(2),105-23.

13.) Begleiter A, Mowat M, Israels LG, Johnston JB. (1996) Chlorambucil in chronic lymphocytic leukemia: mechanism of action. *Leuk Lymphoma*. 23(3-4),187-201.

-
- 14.) Bellosillo B, Villamor N, Colomer D, Pons G, Montserrat E, Gil J. (1999) In vitro evaluation of fludarabine in combination with cyclophosphamide and/or mitoxantrone in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 94(8),2836-43.
- 15.) Benson DA, Boguski MS, Lipman DJ, Ostell J. (1997) GenBank. *Nucleic Acids Res*. 25(1),1-6.
- 16.) Bentley P, Salter R, Blackmore J, Whittaker JA, Hanson JA, Champion AR. (1995) The sensitivity of chronic lymphocytic leukaemia lymphocytes to irradiation in vitro. *Leuk Res*. 19(12),985-8.
- 17.) Beranek DT. (1990) Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat Res*. 231(1),11-30.
- 18.) Blaise R, Masdehors P, Laugé A, Stoppa-Lyonnet D, Alapetite C, Merle-Béral H, Binet JL, Omura S, Magdelénat H, Sabatier L, Delic J. (2001) Chromosomal DNA and p53 stability, ubiquitin system and apoptosis in B-CLL lymphocytes. *Leuk Lymphoma*. 42(6),1173-80.
- 19.) Blaise R, Alapetite C, Masdehors P, Merle-Beral H, Roulin C, Delic J, Sabatier L. (2002) High levels of chromosome aberrations correlate with impaired in vitro radiation-induced apoptosis and DNA repair in human B-chronic lymphocytic leukaemia cells. *Int J Radiat Biol*. 78(8),671-9.
- 20.) Boguski MS, Lowe TM, Tolstoshev CM. (1993) dbEST - database for "expressed sequence tags". *Nat Genet*. 4(4),332-3.
- 21.) Bohr VA, Smith CA, Okumoto DS, Hanawalt PC. (1985) DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell*. 40(2),359-69.
- 22.) Bosanquet AG, Bell PB. (1996) Novel ex vivo analysis of nonclassical, pleiotropic drug resistance and collateral sensitivity induced by therapy provides a rationale for treatment strategies in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 87(5),1962-71.
- 23.) Bramson J, McQuillan A, Aubin R, Alaoui-Jamali M, Batist G, Christodouloupoulos G, Panasci LC. (1995a) Nitrogen mustard drug resistant B-cell chronic lymphocytic leukemia as an in vivo model for crosslinking agent resistance. *Mutat Res*. 336(3),269-78.
- 24.) Bramson J, McQuillan A, Panasci LC. (1995b) DNA repair enzyme expression in chronic lymphocytic leukemia vis-à-vis nitrogen mustard drug resistance. *Cancer Lett*. 90(2),139-48.
- 25.) Brent TP, Houghton PJ, Houghton JA. (1985) O6-Alkylguanine-DNA alkyltransferase activity correlates with the therapeutic response of human rhabdomyosarcoma xenografts to 1-(2-chloroethyl)-3-(trans-4-methylcyclohexyl)-1-nitrosourea. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82(9),2985-9.
- 26.) Bronstein SM, Skopek TR, Swenberg JA. (1992) Efficient repair of O6-ethylguanine, but not O4-ethylthymine or O2-ethylthymine, is dependent upon O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and nucleotide excision repair activities in human cells. *Cancer Res*. 52(7),2008-11.
- 27.) Brown EJ, Baltimore D. (2000) ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev*. 14(4),397-402.
- 28.) Bullrich F, Rasio D, Kitada S, Starostik P, Kipps T, Keating M, Albitar M, Reed JC, Croce CM. (1999) ATM mutations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*. 59(1),24-7.

-
- 29.) Buschfort C, Muller MR, Seeber S, Rajewsky MF, Thomale J. (1997) DNA excision repair profiles of normal and leukemic human lymphocytes: functional analysis at the single-cell level. *Cancer Res.* 57(4),651-8.
- 30.) Caldecott K, Jeggo P. (1991) Cross-sensitivity of gamma-ray-sensitive hamster mutants to cross-linking agents. *Mutat Res.* 255(2),111-21.
- 31.) Caligaris-Cappio F. (2000) Biology of chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol.* 4(1),5-21.
- 32.) Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB, Siliciano JD. (1998) Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science.* 281(5383),1677-9.
- 33.) Cappelli E, Taylor R, Cevasco M, Abbondandolo A, Caldecott K, Frosina G. (1997) Involvement of XRCC1 and DNA ligase III gene products in DNA base excision repair. *J Biol Chem.* 272(38),23970-5.
- 34.) Carney JP, Maser RS, Olivares H, Davis EM, Le Beau M, Yates JR 3rd, Hays L, Morgan WF, Petrini JH. (1998) The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell.* 93(3),477-86.
- 35.) Chaney SG, Sancar A. (1996) DNA repair: enzymatic mechanisms and relevance to drug response. *J Natl Cancer Inst.* 88(19),1346-60.
- 36.) Chang DY, Lu AL. (2002), Functional interaction of MutY homolog with proliferating cell nuclear antigen in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem.* 277(14),11853-8.
- 37.) Chang DY, Lu AL. (2005) Interaction of checkpoint proteins Hus1/Rad1/Rad9 with DNA base excision repair enzyme MutY homolog in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem.* 280(1),408-17.
- 38.) Chao CC. (1996) Cross-resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II) of a multidrug-resistant lymphoma cell line associated with decreased drug accumulation and enhanced DNA repair. *Eur J Pharmacol.* 305(1-3),213-22.
- 39.) Chaudhary PM, Roninson IB. (1991) Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell.* 66(1),85-94.
- 40.) Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O'Brien S, Rai KR. (1996) National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood.* 87(12),4990-7.
- 41.) Christmann M, Pick M, Lage H, Schadendorf D, Kaina B. (2001) Acquired resistance of melanoma cells to the antineoplastic agent fotemustine is caused by reactivation of the DNA repair gene MGMT. *Int J Cancer.* 92(1),123-9.
- 42.) Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B. (2003) Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology.* 193(1-2),3-34.

-
- 43.) Christodoulopoulos G, Fotouhi N, Krajewski S, Reed JC, Alaoui-Jamali M, Panasci L. (1997) Relationship between nitrogen mustard drug resistance in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) and protein expression of Bcl-2, Bax, Bcl-X and p53. *Cancer Lett.* 121(1),59-67.
- 44.) Churchill GA. (2002) Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nat Genet.* 32 Suppl,490-5.
- 45.) Cleaver JE. (2005) Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair. *Nat Rev Cancer.* 5(7),564-73.
- 46.) Colvin, M., Chabner, B.A. (1990) Alkylating agents. In: Chabner, B.A. & Collins, J.M. (eds.): *Cancer Chemotherapy: Principles and Practice*, Lippincott, Philadelphia, pp.276-314.
- 47.) Constantinou A, Davies AA, West SC. (2001) Branch migration and Holliday junction resolution catalyzed by activities from mammalian cells. *Cell.* 104(2),259-68.
- 48.) Coquerelle T, Dosch J, Kaina B. (1995) Overexpression of N-methylpurine-DNA glycosylase in Chinese hamster ovary cells renders them more sensitive to the production of chromosomal aberrations by methylating agents--a case of imbalanced DNA repair. *Mutat Res.* 336(1),9-17.
- 49.) Costanzo V, Robertson K, Bibikova M, Kim E, Grieco D, Gottesman M, Carroll D, Gautier J. (2001) Mre11 protein complex prevents double-strand break accumulation during chromosomal DNA replication. *Mol Cell.* 8(1),137-47.
- 50.) Critchlow SE, Bowater RP, Jackson SP. (1997) Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV. *Curr Biol.* 7(8),588-98.
- 51.) Cromie GA, Connelly JC, Leach DR. (2001) Recombination at double-strand breaks and DNA ends: conserved mechanisms from phage to humans. *Mol Cell.* 8(6),1163-74.
- 52.) Curt GA, Clendeninn NJ, Chabner BA. (1984) Drug resistance in cancer. *Cancer Treat Rep.* 68(1),87-99.
- 53.) Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman SM, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N. (1999) Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 94(6),1840-7.
- 54.) D'Amours D, Jackson SP. (2002) The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3(5):317-27.
- 55.) Day RS 3rd, Ziolkowski CH, Scudiero DA, Meyer SA, Lubiniecki AS, Girardi AJ, Galloway SM, Bynum GD. (1980) Defective repair of alkylated DNA by human tumour and SV40-transformed human cell strains. *Nature.* 288(5792),724-7.
- 56.) Delic J, Morange M, Magdelenat H. (1993) Ubiquitin pathway involvement in human lymphocyte gamma-irradiation-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* 13(8),4875-83.
- 57.) Demple B, Harrison L. (1994) Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu Rev Biochem.* 63,915-48.

- 58.) Deriano L, Guipaud O, Merle-Béral H, Binet JL, Ricoul M, Potocki-Veronese G, Favaudon V, Maciorowski Z, Muller C, Salles B, Sabatier L, Delic J. (2005) Human chronic lymphocytic leukemia B cells can escape DNA damage-induced apoptosis through the nonhomologous end-joining DNA repair pathway. *Blood*. 105(12),4776-83.
- 59.) Dianov G, Price A, Lindahl T. (1992) Generation of single-nucleotide repair patches following excision of uracil residues from DNA. *Mol Cell Biol*. 12(4),1605-12.
- 60.) Dianov GL, Prasad R, Wilson SH, Bohr VA. (1999) Role of DNA polymerase beta in the excision step of long patch mammalian base excision repair. *J Biol Chem*. 274(20),13741-3.
- 61.) Dighiero G, Maloum K, Desablens B, Cazin B, Navarro M, Leblay R, Leporrier M, Jaubert J, Lepeu G, Dreyfus B, Binet JL, Travade P. (1998) Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 338(21),1506-14.
- 62.) Dighiero G, Binet JL. (2000) When and how to treat chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 343(24),1799-801.
- 63.) Dikomey E, Dahm-Daphi J, Brammer I, Martensen R, Kaina B. (1998) Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines. *Int J Radiat Biol*. 73(3),269-78.
- 64.) Dolan ME, Larkin GL, English HF, Pegg AE. (1989) Depletion of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in mammalian tissues and human tumor xenografts in nude mice by treatment with O6-methylguanine. *Cancer Chemother Pharmacol*. 25(2),103-8.
- 65.) Drablos F, Feyzi E, Aas PA, Vaagbø CB, Kavli B, Bratlie MS, Peña-Diaz J, Otterlei M, Slupphaug G, Krokan HE. (2004) Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst)*. 3(11),1389-407.
- 66.) Duckett DR, Drummond JT, Murchie AI, Reardon JT, Sancar A, Lilley DM, Modrich P. (1996) Human MutSalpha recognizes damaged DNA base pairs containing O6-methylguanine, O4-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG) adduct. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(13),6443-7.
- 67.) Dumenco LL, Allay E, Norton K, Gerson SL. (1993) The prevention of thymic lymphomas in transgenic mice by human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Science*. 259(5092),219-22.
- 68.) Eberhardt W, Wilke H, Stamatis G, Stuschke M, Harstrick A, Menker H, Krause B, Müller MR, Stahl M, Flasshove M, Budach V, Greschuchna D, Konietzko N, Sack H, Seeber S. (1998) Preoperative chemotherapy followed by concurrent chemoradiation therapy based on hyperfractionated accelerated radiotherapy and definitive surgery in locally advanced non-small-cell lung cancer: mature results of a phase II trial. *J Clin Oncol*. 16(2),622-34.
- 69.) Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(25),14863-8.
- 70.) el Roubi S, Thomas A, Costin D, Rosenberg CR, Potmesil M, Silber R, Newcomb EW. (1993) p53 gene mutation in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated with drug resistance and is independent of MDR1/MDR3 gene expression. *Blood*. 82(11),3452-9.

- 71.) Engelbergs J, Thomale J, Galhoff A, Rajewsky MF. (1998) Fast repair of O6-ethylguanine, but not O6-methylguanine, in transcribed genes prevents mutation of H-ras in rat mammary tumorigenesis induced by ethylnitrosourea in place of methylnitrosourea. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(4),1635-40.
- 72.) Essers J, Hendriks RW, Swagemakers SM, Troelstra C, de Wit J, Bootsma D, Hoeijmakers JH, Kanaar R. (1997) Disruption of mouse RAD54 reduces ionizing radiation resistance and homologous recombination. *Cell*. 89(2),195-204.
- 73.) Evensen G, Seeberg E. (1982) Adaptation to alkylation resistance involves the induction of a DNA glycosylase. *Nature*. 296(5859),773-5.
- 74.) Fishel ML, Seo YR, Smith ML, Kelley MR. (2003) Imbalancing the DNA base excision repair pathway in the mitochondria; targeting and overexpressing N-methylpurine DNA glycosylase in mitochondria leads to enhanced cell killing. *Cancer Res*. 63(3),608-15.
- 75.) Fodor SP, Rava RP, Huang XC, Pease AC, Holmes CP, Adams CL. (1993) Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature*. 364(6437),555-6.
- 76.) Foon KA, Rai KR, Gale RP. (1990) Chronic lymphocytic leukemia: new insights into biology and therapy. *Ann Intern Med*. 113(7),525-39.
- 77.) Frankfurt OS, Krishan A. (2001) Identification of apoptotic cells by formamide-induced dna denaturation in condensed chromatin. *J Histochem Cytochem*. 49(3),369-78.
- 78.) Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W. (1995) *DNA Repair and Mutagenesis*. ASM, Washington, D.C.
- 79.) Friedberg EC. (2001) How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer*. 1(1),22-33.
- 80.) Friedrich-Heineken E, Toueille M, Tännler B, Bürki C, Ferrari E, Hottiger MO, Hübscher U. (2005) The two DNA clamps Rad9/Rad1/Hus1 complex and proliferating cell nuclear antigen differentially regulate flap endonuclease 1 activity. *J Mol Biol*. 353(5),980-9.
- 81.) Fugmann SD, Lee AI, Shockett PE, Villey IJ, Schatz DG. (2000) The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu Rev Immunol*. 18,495-527.
- 82.) Gary R, Kim K, Cornelius HL, Park MS, Matsumoto Y. (1999) Proliferating cell nuclear antigen facilitates excision in long-patch base excision repair. *J Biol Chem*. 274(7),4354-63.
- 83.) Geleziunas R, McQuillan A, Malapetsa A, Hutchinson M, Kopriva D, Wainberg MA, Hiscott J, Bramson J, Panasci L. (1991) Increased DNA synthesis and repair-enzyme expression in lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia resistant to nitrogen mustards. *J Natl Cancer Inst*. 83(8),557-64.
- 84.) Goth R, Rajewsky MF. (1972) Ethylation of nucleic acids by ethylnitrosourea-1- 14 C in the fetal and adult rat. *Cancer Res*. 32(7),1501-5.
- 85.) Gottesman MM, Pastan I. (1993) Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem*. 62,385-427.

- 86.) Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*. 2(1),48-58.
- 87.) Granziero L, Ghia P, Circosta P, Gottardi D, Strola G, Geuna M, Montagna L, Piccoli P, Chilosi M, Caligaris-Cappio F. (2001) Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 97(9),2777-83.
- 88.) Griswold DP, Corbett TH, Schabel FM Jr. (1981) Clonogenicity and growth of experimental tumors in relation to developing resistance and therapeutic failure. *Cancer Treat Rep*. 65 Suppl 2,51-4.
- 89.) Haber JE. (2000) Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet*. 16(6),259-64.
- 90.) Halgren RG, Fielden MR, Fong CJ, Zacharewski TR. (2001) Assessment of clone identity and sequence fidelity for 1189 IMAGE cDNA clones. *Nucleic Acids Res*. 29(2),582-8.
- 91.) Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. (1999) Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 94(6),1848-54.
- 92.) Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC. (1993) bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 82(6),1820-8.
- 93.) Hanawalt PC. (2001) Controlling the efficiency of excision repair. *Mutat Res*. 485(1),3-13.
- 94.) Hanawalt PC. (2002) Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene*. 21(58),8949-56.
- 95.) Hanawalt PC, Ford JM, Lloyd DR. (2003) Functional characterization of global genomic DNA repair and its implications for cancer. *Mutat Res*. 544(2-3),107-14.
- 96.) Harris AL, Hochhauser D. (1992) Mechanisms of multidrug resistance in cancer treatment. *Acta Oncol*. 31(2),205-13.
- 97.) Hashimoto K, Tominaga Y, Nakabeppu Y, Moriya M. (2004) Futile short-patch DNA base excision repair of adenine:8-oxoguanine mispair. *Nucleic Acids Res*. 32(19),5928-34.
- 98.) Havemann, K., Wolf, M. (1997) Lungentumoren. in: Ostendorf, P. C. & Seeber, S. (Hrsg.): *Hämatologie Onkologie*. Kapitel XI 53, 606-643.
- 99.) Havlik RJ, Yancik R, Long S, Ries L, Edwards B. (1994) The National Institute on Aging and the National Cancer Institute SEER collaborative study on comorbidity and early diagnosis of cancer in the elderly. *Cancer*. 74(7 Suppl),2101-6.
- 100.) Hawley RS, Friend SH. (1996) Strange bedfellows in even stranger places: the role of ATM in meiotic cells, lymphocytes, tumors, and its functional links to p53. *Genes Dev*. 10(19),2383-8.
- 101.) Hershko A, Ciechanover A. (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*. 67,425-79.

102.) Herzog KH, Chong MJ, Kapsetaki M, Morgan JI, McKinnon PJ. (1998) Requirement for Atm in ionizing radiation-induced cell death in the developing central nervous system. *Science*. 280(5366),1089-91.

103.) Higby DJ, Wallace HJ Jr, Albert DJ, Holland JF. (1974) Diaminodichloroplatinum: a phase I study showing responses in testicular and other tumors. *Cancer*. 33(5),1219-5.

104.) Hirano S, Tominaga Y, Ichinoe A, Ushijima Y, Tsuchimoto D, Honda-Ohnishi Y, Ohtsubo T, Sakumi K, Nakabeppu Y. (2003) Mutator phenotype of MUTYH-null mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem*. 278(40),38121-4.

105.) Hirao A, Kong YY, Matsuoka S, Wakeham A, Ruland J, Yoshida H, Liu D, Elledge SJ, Mak TW. (2000) DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science*. 287(5459),1824-7.

106.) Hoeijmakers JH. (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 411(6835),366-74.

107.) Hopfner KP, Craig L, Moncalian G, Zinkel RA, Usui T, Owen BA, Karcher A, Henderson B, Bodmer JL, McMurray CT, Carney JP, Petrini JH, Tainer JA. (2002a) The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature*. 418(6897),562-6.

108.) Hopfner KP, Putnam CD, Tainer JA. (2002b) DNA double-strand break repair from head to tail. *Curr Opin Struct Biol*. 12(1),115-22.

109.) Hoy CA, Thompson LH, Mooney CL, Salazar EP. (1985) Defective DNA cross-link removal in Chinese hamster cell mutants hypersensitive to bifunctional alkylating agents. *Cancer Res*. 45(4),1737-43.

110.) Iyer RR, Pluciennik A, Burdett V, Modrich PL. (2006) DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem Rev*. 106(2),302-23.

111.) Izumi T, Wiederhold LR, Roy G, Roy R, Jaiswal A, Bhakat KK, Mitra S, Hazra TK. (2003) Mammalian DNA base excision repair proteins: their interactions and role in repair of oxidative DNA damage. *Toxicology*. 193(1-2),43-65.

112.) Jain AK, Dubes RC. (1988) Algorithms for Clustering Data. *Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ*.

113.) Jeggo P, Defais M, Samson L, Schendel P. (1978) The adaptive response of E.coli to low levels of alkylating agent: the role of polA in killing adaptation. *Mol Gen Genet*. 162(3),299-305.

114.) Johnson RD, Jasin M. (2000) Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *EMBO J*. 19(13),3398-407.

115.) Johnston JB, Daeninck P, Verburg L, Lee K, Williams G, Israels LG, Mowat MR, Begleiter A. (1997) P53, MDM-2, BAX and BCL-2 and drug resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 26(5-6),435-49.

116.) Jones S, Emmerson P, Maynard J, Best JM, Jordan S, Williams GT, Sampson JR, Cheadle JP. (2002) Biallelic germline mutations in MYH predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G:C-->T:A mutations. *Hum Mol Genet*. 11(23),2961-7.

-
- 117.) Kaina B.** (2004) Mechanisms and consequences of methylating agent-induced SCEs and chromosomal aberrations: a long road traveled and still a far way to go. *Cytogenet Genome Res.* 104(1-4),77-86.
- 118.) Kaina B, Christmann M, Naumann S, Roos WP.** (2007) MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst).* 6(8),1079-99.
- 119.) Karran P, Stevens S, Sedgwick B.** (1982) The adaptive response to alkylating agents: the removal of O6-methylguanine from DNA is not dependent on DNA polymerase-1. *Mutat Res.* 104(1-3),67-73.
- 120.) Kastan MB, Schlaffer E, Russo JE, Colvin OM, Civin CI, Hilton J.** (1990) Direct demonstration of elevated aldehyde dehydrogenase in human hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 75(10),1947-50.
- 121.) Kawate H, Sakumi K, Tsuzuki T, Nakatsuru Y, Ishikawa T, Takahashi S, Takano H, Noda T, Sekiguchi M.** (1998) Separation of killing and tumorigenic effects of an alkylating agent in mice defective in two of the DNA repair genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(9),5116-20.
- 122.) Keating MJ.** (2001) Progress in CLL, chemotherapy, antibodies and transplantation. *Biomed Pharmacother.* 55(9-10),524-8.
- 123.) Keating MJ, O'Brien S, Albitar M.** (2002a) Emerging information on the use of rituximab in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol.* 29(1 Suppl 2),70-4.
- 124.) Keating MJ, Flinn I, Jain V, Binet JL, Hillmen P, Byrd J, Albitar M, Brettman L, Santabarbara P, Wacker B, Rai KR.** (2002b) Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study. *Blood.* 99(10),3554-61.
- 125.) Kelman Z, Hurwitz J.** (1998) Protein-PCNA interactions: a DNA-scanning mechanism? *Trends Biochem Sci.* 23(7),236-8.
- 126.) Khanna KK, Jackson SP.** (2001) DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet.* 27(3),247-54.
- 127.) Kipps TJ.** (2002) Advances in classification and therapy of indolent B-cell malignancies. *Semin Oncol.* 29(1 Suppl 2),98-104.
- 128.) Kitada S, Andersen J, Akar S, Zapata JM, Takayama S, Krajewski S, Wang HG, Zhang X, Bullrich F, Croce CM, Rai K, Hines J, Reed JC.** (1998) Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood.* 91(9),3379-89.
- 129.) Klungland A, Lindahl T.** (1997) Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *EMBO J.* 16(11),3341-8.
- 130.) Korsmeyer SJ.** (1992) Chromosomal translocations in lymphoid malignancies reveal novel proto-oncogenes. *Annu Rev Immunol.* 10,785-807.

-
- 131.) Krokan HE, Standal R, Slupphaug G. (1997) DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochem J.* 325(Pt 1),1-16.
- 132.) Kruh GD, Belinsky MG. (2003) The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene.* 22(47),7537-52.
- 133.) Kurz EU, Lees-Miller SP. (2004) DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. *DNA Repair (Amst).* 3(8-9),889-900.
- 134.) Lavin MF, Birrell G, Chen P, Kozlov S, Scott S, Gueven N. (2005) ATM signaling and genomic stability in response to DNA damage. *Mutat Res.* 569(1-2),123-32.
- 135.) Lawley PD, Brookes P. (1967) Interstrand cross-linking of DNA by difunctional alkylating agents. *J Mol Biol.* 25(1),143-60.
- 136.) Lee ML, Kuo FC, Whitmore GA, Sklar J. (2000) Importance of replication in microarray gene expression studies: statistical methods and evidence from repetitive cDNA hybridizations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(18),9834-9.
- 137.) Levis WR, Dattner AM, Shaw JS. (1979) Selective defects in T cell function in ataxia-telangiectasia. *Clin Exp Immunol.* 37(1),44-9.
- 138.) Li Z, Otevrel T, Gao Y, Cheng HL, Seed B, Stamato TD, Taccioli GE, Alt FW. (1995) The XRCC4 gene encodes a novel protein involved in DNA double-strand break repair and V(D)J recombination. *Cell.* 83(7),1079-89.
- 139.) Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K. (2004) The mechanism of vertebrate nonhomologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination. *DNA Repair (Amst).* 3(8-9),817-26.
- 140.) Lijinsky W, Pegg AE, Anver MR, Moschel RC. (1994) Effects of inhibition of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase in rats on carcinogenesis by methylnitrosourea and ethylnitrosourea. *Jpn J Cancer Res.* 85(3),226-30.
- 141.) Lindahl T, Nyberg B. (1972) Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry.* 11(19),3610-8.
- 142.) Lindahl T, Demple B, Robins P. (1982) Suicide inactivation of the E. coli O6-methylguanine-DNA methyltransferase. *EMBO J.* 1(11),1359-63.
- 143.) Lindahl T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature.* 362(6422),709-15.
- 144.) Lindahl T, Wood RD. (1999) Quality control by DNA repair. *Science.* 286(5446),1897-905.
- 145.) Link CJ Jr, Mitchell DL, Nairn RS, Bohr VA. (1992) Preferential and strand-specific DNA repair of (6-4) photoproducts detected by a photochemical method in the hamster DHFR gene. *Carcinogenesis.* 13(11),1975-80.
- 146.) Lips J, Kaina B. (2001) DNA double-strand breaks trigger apoptosis in p53-deficient fibroblasts. *Carcinogenesis.* 22(4),579-85.

-
- 147.) Lipshutz RJ, Fodor SP, Gingeras TR, Lockhart DJ. (1999) High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet.* 21(1 Suppl),20-4.
- 148.) Liu N, Lamerdin JE, Tebbs RS, Schild D, Tucker JD, Shen MR, Brookman KW, Siciliano MJ, Walter CA, Fan W, et al. (1998) XRCC2 and XRCC3, new human Rad51-family members, promote chromosome stability and protect against DNA cross-links and other damages. *Mol Cell.* 1(6),783-93.
- 149.) Liu L, Gerson SL. (2004) Therapeutic impact of methoxyamine: blocking repair of abasic sites in the base excision repair pathway. *Curr Opin Investig Drugs.* 5(6),623-7.
- 150.) Lu AL, Bai H, Shi G, Chang DY. (2006) MutY and MutY homologs (MYH) in genome maintenance. *Front Biosci.* 11,3062-80.
- 151.) Luo G, Yao MS, Bender CF, Mills M, Bladl AR, Bradley A, Petrini JH. (1999) Disruption of mRad50 causes embryonic stem cell lethality, abnormal embryonic development, and sensitivity to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(13),7376-81.
- 152.) Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, Cavalieri RJ, Boland CR. (1993) Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology.* 104(5),1535-49.
- 153.) Madhusudan S, Middleton MR. (2005) The emerging role of DNA repair proteins as predictive, prognostic and therapeutic targets in cancer. *Cancer Treat Rev.* 31(8),603-17.
- 154.) Marie JP, Simonin G, Legrand O, Delmer A, Faussat AM, Lewis AD, Sikic BI, Zittoun R. (1995) Glutathione-S-transferases pi, alpha, mu and mdr1 mRNA expression in normal lymphocytes and chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 9(10),1742-7.
- 155.) Masutani C, Sugasawa K, Yanagisawa J, Sonoyama T, Ui M, Enomoto T, Takio K, Tanaka K, van der Spek PJ, Bootsma D, et al. (1994) Purification and cloning of a nucleotide excision repair complex involving the xeroderma pigmentosum group C protein and a human homologue of yeast RAD23. *EMBO J.* 13(8),1831-43.
- 156.) Matsumoto Y, Kim K, Hurwitz J, Gary R, Levin DS, Tomkinson AE, Park MS. (1999) Reconstitution of proliferating cell nuclear antigen-dependent repair of apurinic/apyrimidinic sites with purified human proteins. *J Biol Chem.* 274(47),33703-8.
- 157.) May A, Nairn RS, Okumoto DS, Wassermann K, Stevnsner T, Jones JC, Bohr VA. (1993) Repair of individual DNA strands in the hamster dihydrofolate reductase gene after treatment with ultraviolet light, alkylating agents, and cisplatin. *J Biol Chem.* 268(3),1650-7.
- 158.) Maze R, Hanenberg H, Williams DA. (1997) Establishing chemoresistance in hematopoietic progenitor cells. *Mol Med Today.* 3(8),350-8.
- 159.) McWhir J, Selfridge J, Harrison DJ, Squires S, Melton DW. (1993) Mice with DNA repair gene (ERCC-1) deficiency have elevated levels of p53, liver nuclear abnormalities and die before weaning. *Nat Genet.* 5(3),217-24.
- 160.) Mello JA, Acharya S, Fishel R, Essigmann JM. (1996) The mismatch-repair protein hMSH2 binds selectively to DNA adducts of the anticancer drug cisplatin. *Chem Biol.* 3(7),579-89.

-
- 161.) Mellon I, Spivak G, Hanawalt PC.** (1987) Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell*. 51(2),241-9.
- 162.) Metcalfe JA, Parkhill J, Campbell L, Stacey M, Biggs P, Byrd PJ, Taylor AM.** (1996) Accelerated telomere shortening in ataxia telangiectasia. *Nat Genet*. 13(3),350-3.
- 163.) Meyn MS.** (1995) Ataxia-telangiectasia and cellular responses to DNA damage. *Cancer Res*. 55(24),5991-6001.
- 164.) Milligan JF, Groebe DR, Witherell GW, Uhlenbeck OC.** (1987) Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Res*. 15(21),8783-98.
- 165.) Mochan TA, Venere M, DiTullio RA Jr, Halazonetis TD.** (2003) 53BP1 and NFB1/MDC1-Nbs1 function in parallel interacting pathways activating ataxia-telangiectasia mutated (ATM) in response to DNA damage. *Cancer Res*. 63(24),8586-91.
- 166.) Modrich P, Lahue R.** (1996) Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem*. 65,101-33.
- 167.) Morabito F, Filangeri M, Callea I, Sculli G, Callea V, Fracchiolla NS, Neri A, Brugiattelli M.** (1997) Bcl-2 protein expression and p53 gene mutation in chronic lymphocytic leukemia: correlation with in vitro sensitivity to chlorambucil and purine analogs. *Haematologica*. 82(1),16-20.
- 168.) Moreno-Herrero F, de Jager M, Dekker NH, Kanaar R, Wyman C, Dekker C.** (2005) Mesoscale conformational changes in the DNA-repair complex Rad50/Mre11/Nbs1 upon binding DNA. *Nature*. 437(7057),440-3.
- 169.) Moriya M.** (1993) Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted G.C-->T.A transversions in simian kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90(3),1122-6.
- 170.) Morrow CS, Cowan KH.** (1990) Glutathione S-transferases and drug resistance. *Cancer Cells*. 2(1),15-22.
- 171.) Moufarij MA, Sampath D, Keating MJ, Plunkett W.** (2006) Fludarabine increases oxaliplatin cytotoxicity in normal and chronic lymphocytic leukemia lymphocytes by suppressing interstrand DNA crosslink removal. *Blood*. 108(13),4187-93.
- 172.) Mujumdar RB, Ernst LA, Mujumdar SR, Lewis CJ, Waggoner AS.** (1993) Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters. *Bioconjug Chem*. 4(2),105-11.
- 173.) Mullenders LH, Berneburg M.** (2001) Photoimmunology and nucleotide excision repair: impact of transcription coupled and global genome excision repair. *J Photochem Photobiol B*. 65(2-3),97-100.
- 174.) Muller C, Salles B.** (1997) Regulation of DNA-dependent protein kinase activity in leukemic cells. *Oncogene*. 15(19),2343-8.
- 175.) Muller C, Christodoulopoulos G, Salles B, Panasci L.** (1998) DNA-Dependent protein kinase activity correlates with clinical and in vitro sensitivity of chronic lymphocytic leukemia lymphocytes to nitrogen mustards. *Blood*. 92(7),2213-9.

-
- 176.) Murray GI, Taylor MC, McFadyen MC, McKay JA, Greenlee WF, Burke MD, Melvin WT. (1997) Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Res.* 57(14),3026-31.
- 177.) Myllyperkiö MH, Koski TR, Vilpo LM, Vilpo JA. (2000) Kinetics of excision repair of UV-induced DNA damage, measured using the comet assay. *Mutat Res.* 448(1),1-9.
- 178.) Nakamura J, Walker VE, Upton PB, Chiang SY, Kow YW, Swenberg JA. (1998) Highly sensitive apurinic/apyrimidinic site assay can detect spontaneous and chemically induced depurination under physiological conditions. *Cancer Res.* 58(2),222-5.
- 179.) Nance MA, Berry SA. (1992) Cockayne syndrome: review of 140 cases. *Am J Med Genet.* 42(1),68-84.
- 180.) Nash RA, Caldecott KW, Barnes DE, Lindahl T. (1997) XRCC1 protein interacts with one of two distinct forms of DNA ligase III. *Biochemistry.* 36(17),5207-11.
- 181.) Nebert DW, Negishi M, Enquist LW, Swan DC. (1982) Use of recombinant DNA technology in the study of genetic differences in drug metabolism affecting individual risk of malignancy. In Harris CC and Cerutti PA (ed.), *Mechanism of Chemical Carcinogenesis*, p. 351-362, Alan R. Liss, Inc., New York
- 182.) Nebert DW, Gonzalez FJ. (1987) P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu Rev Biochem.* 56,945-93.
- 183.) Nehls P, Rajewsky MF. (1990) Monoclonal antibody-based immunoassay for the determination of cellular enzymatic activity for repair of specific carcinogen-DNA adducts (O6-alkylguanine). *Carcinogenesis.* 11(1),81-7.
- 184.) Nilsen H, Krokan HE. (2001) Base excision repair in a network of defence and tolerance. *Carcinogenesis.* 22(7),987-98.
- 185.) Norbury CJ, Zhivotovsky B. (2004) DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene.* 23(16),2797-808.
- 186.) Ohtsubo T, Nishioka K, Imaiso Y, Iwai S, Shimokawa H, Oda H, Fujiwara T, Nakabeppu Y. (2000) Identification of human MutY homolog (hMYH) as a repair enzyme for 2-hydroxyadenine in DNA and detection of multiple forms of hMYH located in nuclei and mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 28(6),1355-64.
- 187.) Panasci L, Henderson D, Torres-Garcia SJ, Skalski V, Caplan S, Hutchinson M. (1988), Transport, metabolism, and DNA interaction of melphalan in lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res.* 48(7),1972-6.
- 188.) Panasci L, Paiement JP, Christodouloupoulos G, Belenkov A, Malapetsa A, Aloyz R. (2001) Chlorambucil drug resistance in chronic lymphocytic leukemia: the emerging role of DNA repair. *Clin Cancer Res.* 7(3),454-61.
- 189.) Pandita TK, Lieberman HB, Lim DS, Dhar S, Zheng W, Taya Y, Kastan MB. (2000) Ionizing radiation activates the ATM kinase throughout the cell cycle. *Oncogene.* 19(11),1386-91.
- 190.) Pâques F, Haber JE. (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63(2),349-404.

- 191.) **Park Y, Gerson SL.** (2005) DNA repair defects in stem cell function and aging. *Annu Rev Med.* 56,495-508.
- 192.) **Parker A, Gu Y, Mahoney W, Lee SH, Singh KK, Lu AL.** (2001) Human homolog of the MutY repair protein (hMYH) physically interacts with proteins involved in long patch DNA base excision repair. *J Biol Chem.* 276(8),5547-55.
- 193.) **Parker AR, Eshleman JR.** (2003) Human MutY: gene structure, protein functions and interactions, and role in carcinogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 60(10),2064-83.
- 194.) **Parsons PG, Carter FB, Morrison L, Regius Mary Sister.** (1981) Mechanism of melphalan resistance developed in vitro in human melanoma cells. *Cancer Res.* 41(4),1525-34.
- 195.) **Parsons PG.** (1984) Dependence on treatment time of melphalan resistance and DNA cross-linking in human melanoma cell lines. *Cancer Res.* 44(7),2773-8.
- 196.) **Pascucci B, Stucki M, Jónsson ZO, Dogliotti E, Hübscher U.** (1999) Long patch base excision repair with purified human proteins. DNA ligase I as patch size mediator for DNA polymerases delta and epsilon. *J Biol Chem.* 274(47),33696-702.
- 197.) **Pastoriza Gallego M, Sarasin A.** (2003) Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine in human cells and its deficiency in some DNA repair diseases. *Biochimie.* 85(11),1073-82.
- 198.) **Patterson LH, Murray GI.** (2002) Tumour cytochrome P450 and drug activation. *Curr Pharm Des.* 8(15),1335-47.
- 199.) **Pegg AE, Dolan ME, Moschel RC.** (1995) Structure, function, and inhibition of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 51,167-223.
- 200.) **Pepper C, Bentley P, Hoy T.** (1996) Regulation of clinical chemoresistance by bcl-2 and bax oncoproteins in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 95(3),513-7.
- 201.) **Pepper C, Thomas A, Hoy T, Bentley P.** (1999) Chlorambucil resistance in B-cell chronic lymphocytic leukaemia is mediated through failed Bax induction and selection of high Bcl-2-expressing subclones. *Br J Haematol.* 104(3),581-8.
- 202.) **Pettitt AR, Sherrington PD, Stewart G, Cawley JC, Taylor AM, Stankovic T.** (2001) p53 dysfunction in B-cell chronic lymphocytic leukemia: inactivation of ATM as an alternative to TP53 mutation. *Blood.* 98(3),814-22.
- 203.) **Petukhova G, Stratton S, Sung P.** (1998) Catalysis of homologous DNA pairing by yeast Rad51 and Rad54 proteins. *Nature.* 393(6680),91-4.
- 204.) **Pfeiffer P, Goedecke W, Kuhfittig-Kulle S, Obe G.** (2004) Pathways of DNA double-strand break repair and their impact on the prevention and formation of chromosomal aberrations. *Cytogenet Genome Res.* 104(1-4),7-13.
- 205.) **Qian X, von Wronski MA, Brent TP.** (1995) Localization of methylation sites in the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter: correlation with gene suppression. *Carcinogenesis.* 16(6),1385-90.

- 206.) **Rabbitts TH.** (1994) Chromosomal translocations in human cancer. *Nature*. 372(6502),143-9.
- 207.) **Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR, Kolitz J, Elias L, Shepherd L, Hines J, Threatte GA, Larson RA, Cheson BD, Schiffer CA.** (2000), Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 343(24),1750-7.
- 208.) **Randerath K, Randerath E, Danna TF, van Golen L, Putman KL.** (1989) A new sensitive 32P-postlabeling assay based on the specific enzymatic conversion of bulky DNA lesions to radiolabeled dinucleotides and nucleoside 5'-monophosphates. *Carcinogenesis*. 10(7),1231-9.
- 209.) **Reed JC.** (1998) Molecular biology of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*. 25(1),11-8.
- 210.) **Reese JS, Qin X, Ballas CB, Sekiguchi M, Gerson SL.** (2001) MGMT expression in murine bone marrow is a major determinant of animal survival after alkylating agent exposure. *J Hematother Stem Cell Res*. 10(1),115-23.
- 211.) **Reese JS, Liu L, Gerson SL.** (2003) Repopulating defect of mismatch repair-deficient hematopoietic stem cells. *Blood*. 102(5),1626-33.
- 212.) **Riballo E, Critchlow SE, Teo SH, Doherty AJ, Priestley A, Broughton B, Kysela B, Beamish H, Plowman N, Arlett CF, Lehmann AR, Jackson SP, Jeggo PA.** (1999) Identification of a defect in DNA ligase IV in a radiosensitive leukaemia patient. *Curr Biol*. 9(13),699-702.
- 213.) **Ribrag V, Massade L, Faussat AM, Dreyfus F, Bayle C, Gouyette A, Marie JP.** (1996) Drug resistance mechanisms in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 10(12),1944-9.
- 214.) **Rich T, Allen RL, Wyllie AH.** (2000) Defying death after DNA damage. *Nature*. 407(6805),777-83.
- 215.) **Richardson C, Jasin M.** (2000) Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks. *Nature*. 405(6787),697-700.
- 216.) **Rosenbaum PR.** (2001), Replicating Effects and Biases. *The American Statistician*. 55(3),223-227
- 217.) **Rosenwald A, Staudt LM.** (2003) Gene expression profiling of diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 44 Suppl 3,S41-7.
- 218.) **Rotman G, Shiloh Y.** (1999) ATM: a mediator of multiple responses to genotoxic stress. *Oncogene*. 18(45),6135-44.
- 219.) **Rummel M.** (1998) Diagnostik und Therapie der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL). *Der Onkologe*. 4(9),808-819.
- 220.) **Samuels BL, Bitran JD.** (1995) High-dose intravenous melphalan: a review. *J Clin Oncol*. 13(7),1786-99.
- 221.) **Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S.** (2004) Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*. 73,39-85.

-
- 222.) Sanderson BJ, Ferguson LR, Denny WA. (1996) Mutagenic and carcinogenic properties of platinum-based anticancer drugs. *Mutat Res.* 355(1-2).59-70.
- 223.) Savitsky K, Sfez S, Tagle DA, Ziv Y, Sartiel A, Collins FS, Shiloh Y, Rotman G. (1995) The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. *Hum Mol Genet.* 4(11).2025-32.
- 224.) Schaeffer L, Moncollin V, Roy R, Staub A, Mezzina M, Sarasin A, Weeda G, Hoeijmakers JH, Egly JM. (1994) The ERCC2/DNA repair protein is associated with the class II BTF2/TFIIH transcription factor. *EMBO J.* 13(10).2388-92.
- 225.) Schaeffer L, Roy R, Humbert S, Moncollin V, Vermeulen W, Hoeijmakers JH, Chambon P, Egly JM. (1993) DNA repair helicase: a component of BTF2 (TFIIH) basic transcription factor. *Science.* 260(5104).58-63.
- 226.) Schaffner C, Stilgenbauer S, Rappold GA, Döhner H, Lichter P. (1999) Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 94(2).748-53.
- 227.) Schärer OD, Jiricny J. (2001) Recent progress in the biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases. *Bioessays.* 23(3).270-81.
- 228.) Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* 270(5235).467-70.
- 229.) Schisselbauer JC, Silber R, Papadopoulos E, Abrams K, LaCreta FP, Tew KD. (1990) Characterization of glutathione S-transferase expression in lymphocytes from chronic lymphocytic leukemia patients. *Cancer Res.* 50(12).3562-8.
- 230.) Schriever F, Huhn D. (2003) New directions in the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs.* 63(10).953-69.
- 231.) Schuler GD, Boguski MS, Stewart EA, Stein LD, Gyapay G, Rice K, White RE, Rodriguez-Tomé P, Aggarwal A, Bajorek E, et al. (1996) A gene map of the human genome. *Science.* 274(5287).540-6.
- 232.) Schwarz K, Ma Y, Pannicke U, Lieber MR. (2003) Human severe combined immune deficiency and DNA repair. *Bioessays.* 25(11).1061-70.
- 233.) Seiler F, Kirstein U, Eberle G, Hochleitner K, Rajewsky MF. (1993) Quantification of specific DNA O-alkylation products in individual cells by monoclonal antibodies and digital imaging of intensified nuclear fluorescence. *Carcinogenesis.* 14(9).1907-13.
- 234.) Selfridge J, Pow AM, McWhir J, Magin TM, Melton DW. (1992) Gene targeting using a mouse HPRT minigene/HPRT-deficient embryonic stem cell system: inactivation of the mouse ERCC-1 gene. *Somat Cell Mol Genet.* 18(4).325-36.
- 235.) Shalon D, Smith SJ, Brown PO. (1996) A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res.* 6(7).639-45.

- 236.) Shi G, Chang DY, Cheng CC, Guan X, Venclovas C, Lu AL. (2006) Physical and functional interactions between MutY glycosylase homologue (MYH) and checkpoint proteins Rad9-Rad1-Hus1. *Biochem J.* 400(1),53-62.
- 237.) Shiloh Y. (1997) Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart. *Annu Rev Genet.* 31,635-62.
- 238.) Shiraishi A, Sakumi K, Sekiguchi M. (2000) Increased susceptibility to chemotherapeutic alkylating agents of mice deficient in DNA repair methyltransferase. *Carcinogenesis.* 21(10),1879-83.
- 239.) Sijbers AM, de Laat WL, Ariza RR, Biggerstaff M, Wei YF, Moggs JG, Carter KC, Shell BK, Evans E, de Jong MC, Rademakers S, de Rooij J, Jaspers NG, Hoeijmakers JH, Wood RD. (1996) Xeroderma pigmentosum group F caused by a defect in a structure-specific DNA repair endonuclease. *Cell.* 86(5),811-22.
- 240.) Silber R, Degar B, Costin D, Newcomb EW, Mani M, Rosenberg CR, Morse L, Drygas JC, Canellakis ZN, Potmesil M. (1994) Chemosensitivity of lymphocytes from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia to chlorambucil, fludarabine, and camptothecin analogs. *Blood.* 84(10),3440-6.
- 241.) Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 175(1),184-91.
- 242.) Sirohi B, Powles R. (2004) Multiple myeloma. *Lancet.* 363(9412),875-87.
- 243.) Skovsgaard T, Nielsen D, Maare C, Wassermann K. (1994) Cellular resistance to cancer chemotherapy. *Int Rev Cytol.* 156,77-157.
- 244.) Smirnova E, Toueille M, Markkanen E, Hübscher U. (2005) The human checkpoint sensor and alternative DNA clamp Rad9-Rad1-Hus1 modulates the activity of DNA ligase I, a component of the long-patch base excision repair machinery. *Biochem J.* 389(Pt 1),13-7.
- 245.) Sobol RW, Horton JK, Kühn R, Gu H, Singhal RK, Prasad R, Rajewsky K, Wilson SH. (1996) Requirement of mammalian DNA polymerase-beta in base-excision repair. *Nature.* 379(6561),183-6.
- 246.) Sobol RW, Prasad R, Evenski A, Baker A, Yang XP, Horton JK, Wilson SH. (2000) The lyase activity of the DNA repair protein beta-polymerase protects from DNA-damage-induced cytotoxicity. *Nature.* 405(6788),807-10.
- 247.) Southern EM, Anand R, Brown WR, Fletcher DS. (1987) A model for the separation of large DNA molecules by crossed field gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 15(15),5925-43.
- 248.) Spanswick VJ, Craddock C, Sekhar M, Mahendra P, Shankaranarayana P, Hughes RG, Hochhauser D, Hartley JA. (2002) Repair of DNA interstrand crosslinks as a mechanism of clinical resistance to melphalan in multiple myeloma. *Blood.* 100(1),224-9.
- 249.) Stankovic T, Weber P, Stewart G, Bedenham T, Murray J, Byrd PJ, Moss PA, Taylor AM. (1999) Inactivation of ataxia telangiectasia mutated gene in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet.* 353(9146),26-9.

-
- 250.) Stankovic T, Stewart GS, Fegan C, Biggs P, Last J, Byrd PJ, Keenan RD, Moss PA, Taylor AM.** (2002) Ataxia telangiectasia mutated-deficient B-cell chronic lymphocytic leukemia occurs in pregerminal center cells and results in defective damage response and unrepaired chromosome damage. *Blood*. 99(1),300-9.
- 251.) Starostik P, Manshouri T, O'Brien S, Freireich E, Kantarjian H, Haidar M, Lerner S, Keating M, Albitar M.** (1998) Deficiency of the ATM protein expression defines an aggressive subgroup of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*. 58(20),4552-7.
- 252.) Staudt LM.** (2003) Molecular diagnosis of the hematologic cancers. *N Engl J Med*. 348(18),1777-85.
- 253.) Stewart GS, Maser RS, Stankovic T, Bressan DA, Kaplan MI, Jaspers NG, Raams A, Byrd PJ, Petrini JH, Taylor AM.** (1999) The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell*. 99(6),577-87.
- 254.) Stilgenbauer S, Lichter P, Döhner H.** (2000) Genetic features of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol*. 4(1),48-72.
- 255.) Stracker TH, Theunissen JW, Morales M, Petrini JH.** (2004) The Mre11 complex and the metabolism of chromosome breaks: the importance of communicating and holding things together. *DNA Repair (Amst)*. 3(8-9),845-54.
- 256.) Sugasawa K, Ng JM, Masutani C, Iwai S, van der Spek PJ, Eker AP, Hanaoka F, Bootsma D, Hoeijmakers JH.** (1998) Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell*. 2(2),223-32.
- 257.) Suzuki K, Kodama S, Watanabe M.** (1999) Recruitment of ATM protein to double strand DNA irradiated with ionizing radiation. *J Biol Chem*. 274(36),25571-5.
- 258.) Takao M, Zhang QM, Yonei S, Yasui A.** (1999) Differential subcellular localization of human MutY homolog (hMYH) and the functional activity of adenine:8-oxoguanine DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res*. 27(18),3638-44.
- 259.) Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Fukushima T, Morrison C, Albala JS, Swagemakers SM, Kanaar R, Thompson LH, Takeda S.** (2000) The Rad51 paralog Rad51B promotes homologous recombinational repair. *Mol Cell Biol*. 20(17),6476-82.
- 260.) Tanaka T, Yamagami T, Oka Y, Nomura T, Sugiyama H.** (1993) The scid mutation in mice causes defects in the repair system for both double-strand DNA breaks and DNA cross-links. *Mutat Res*. 288(2),277-80.
- 261.) Taylor AM, Metcalfe JA, Thick J, Mak YF.** (1996) Leukemia and lymphoma in ataxia telangiectasia. *Blood*. 87(2),423-38.
- 262.) Thomale J, Hochleitner K, Rajewsky MF.** (1994) Differential formation and repair of the mutagenic DNA alkylation product O6-ethylguanine in transcribed and nontranscribed genes of the rat. *J Biol Chem*. 269(3),1681-6.

- 263.) Thomale J, Müller MR, Buschfort C, Seeber S, Rajewski MF. (1998) Alterations of DNA repair: implications for leukemia cell biology. In: Hiddemann W, Büchner T, Wörmann B, et al. eds. *Haematology and Blood Transfusion*, 7, Alterations of DNA repair: implications for leukemia cell biology. Berlin: Springer. 3-18.
- 264.) Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. 35(3),206-21.
- 265.) Toueille M, El-Andaloussi N, Frouin I, Freire R, Funk D, Shevelev I, Friedrich-Heineken E, Villani G, Hottiger MO, Hübscher U. (2004) The human Rad9/Rad1/Hus1 damage sensor clamp interacts with DNA polymerase beta and increases its DNA substrate utilisation efficiency: implications for DNA repair. *Nucleic Acids Res*. 32(11),3316-24.
- 266.) Townsend DM, Tew KD. (2003) The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*. 22(47),7369-75.
- 267.) Uhrhammer N, Bay JO, Perlman S, Gatti RA . (2002) Ataxia-Telangiectasia and variants. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*.
- 268.) Umar A, Kunkel TA. (1996) DNA-replication fidelity, mismatch repair and genome instability in cancer cells. *Eur J Biochem*. 238(2),297-307.
- 269.) van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R. (2001) Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet*. 2(3),196-206.
- 270.) van Hoffen A, Natarajan AT, Mayne LV, van Zeeland AA, Mullenders LH, Venema J. (1993) Deficient repair of the transcribed strand of active genes in Cockayne's syndrome cells. *Nucleic Acids Res*. 21(25),5890-5.
- 271.) Vanasse GJ, Concannon P, Willerford DM. (1999) Regulated genomic instability and neoplasia in the lymphoid lineage. *Blood*. 94(12),3997-4010.
- 272.) Varon R, Vissinga C, Platzer M, Cerosaletti KM, Chrzanowska KH, Saar K, Beckmann G, Seemanová E, Cooper PR, Nowak NJ, et al. (1998) Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell*. 93(3),467-76.
- 273.) Venema J, van Hoffen A, Natarajan AT, van Zeeland AA, Mullenders LH. (1990) The residual repair capacity of xeroderma pigmentosum complementation group C fibroblasts is highly specific for transcriptionally active DNA. *Nucleic Acids Res*. 18(3),443-8.
- 274.) Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. (1994) The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*. 369(6481),574-8.
- 275.) Wagner R Jr, Meselson M. (1976) Repair tracts in mismatched DNA heteroduplexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 73(11),4135-9.
- 276.) Wang W, Brandt P, Rossi ML, Lindsey-Boltz L, Podust V, Fanning E, Sancar A, Bambara RA. (2004) The human Rad9-Rad1-Hus1 checkpoint complex stimulates flap endonuclease 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(48),16762-7.

- 277.) Wang W, Lindsey-Boltz LA, Sancar A, Bambara RA. (2006) Mechanism of stimulation of human DNA ligase I by the Rad9-rad1-Hus1 checkpoint complex. *J Biol Chem.* 30,20865-72.
- 278.) Wattel E, Preudhomme C, Hecquet B, Vanrumbeke M, Quesnel B, Dervite I, Morel P, Fenaux P. (1994) p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood.* 84(9),3148-57.
- 279.) Williams RS, Williams JS, Tainer JA. (2007) Mre11-Rad50-Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling, and the chromatin template. *Biochem Cell Biol.* 85(4),509-20.
- 280.) Wood RD. (1996) DNA repair in eukaryotes. *Annu Rev Biochem.* 65,135-67.
- 281.) Wyman C, Ristic D, Kanaar R. (2004) Homologous recombination-mediated double-strand break repair. *DNA Repair (Amst).* 3(8-9),827-33.
- 282.) Xiao Y, Weaver DT. (1997) Conditional gene targeted deletion by Cre recombinase demonstrates the requirement for the double-strand break repair Mre11 protein in murine embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 25(15),2985-91.
- 283.) Xie Y, Yang H, Cunanan C, Okamoto K, Shibata D, Pan J, Barnes DE, Lindahl T, McIlhatton M, Fishel R, Miller JH. (2004) Deficiencies in mouse Myh and Ogg1 result in tumor predisposition and G to T mutations in codon 12 of the K-ras oncogene in lung tumors. *Cancer Res.* 64(9),3096-102.
- 284.) Xu Y, Ashley T, Brainerd EE, Bronson RT, Meyn MS, Baltimore D. (1996) Targeted disruption of ATM leads to growth retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma. *Genes Dev.* 10(19),2411-22.
- 285.) Yanagihara ET, Blaisdell RK, Hayashi T, Lukes RJ. (1989) Malignant lymphoma in Hawaii-Japanese: a retrospective morphologic survey. *Hematol Oncol.* 7(3),219-32.
- 286.) Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J, Speed TP. (2002) Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res.* 30(4),e15.
- 287.) Yang J, Xu ZP, Huang Y, Hamrick HE, Duerksen-Hughes PJ, Yu YN. (2004) ATM and ATR: sensing DNA damage. *World J Gastroenterol.* 10(2),155-60.
- 288.) Yang YG, Saidi A, Frappart PO, Min W, Barrucand C, Dumon-Jones V, Michelon J, Herceg Z, Wang ZQ. (2006) Conditional deletion of Nbs1 in murine cells reveals its role in branching repair pathways of DNA double-strand breaks. *EMBO J.* 25(23),5527-38.
- 289.) Yarosh DB, Foote RS, Mitra S, Day RS 3rd. (1983) Repair of O6-methylguanine in DNA by demethylation is lacking in Mer- human tumor cell strains. *Carcinogenesis.* 4(2),199-205.
- 290.) Yeh YC, Chang DY, Masin J, Lu AL. (1991) Two nicking enzyme systems specific for mismatch-containing DNA in nuclear extracts from human cells. *J Biol Chem.* 266(10),6480-4.
- 291.) Zak P, Kleibl K, Laval F. (1994) Repair of O6-methylguanine and O4-methylthymine by the human and rat O6-methylguanine-DNA methyltransferases. *J Biol Chem.* 269(1),730-3.

292.) Zakian VA. (1995) ATM-related genes: what do they tell us about functions of the human gene? *Cell*. 82(5),685-7.

293.) Zeller W.J. (1995) Allgemeine Tumorthherapie: Stickstoff-Lost-Derivate, Nitrosoharnstoffe, monofunktionelle und nicht-klassische Alkylantien. In: *Zeller, W.J. & zur Hausen W. (eds.): Onkologie. Ecomed Verlagsgesellschaft München.*

294.) Zhou BB, Elledge SJ. (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*. 408(6811),433-9.

295.) Zhou ZQ, Manguino D, Kewitt K, Intano GW, McMahan CA, Herbert DC, Hanes M, Reddick R, Ikeno Y, Walter CA. (2001) Spontaneous hepatocellular carcinoma is reduced in transgenic mice overexpressing human O6- methylguanine-DNA methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(22),12566-71.

296.) Zhu J, Petersen S, Tessarollo L, Nussenzweig A. (2001) Targeted disruption of the Nijmegen breakage syndrome gene NBS1 leads to early embryonic lethality in mice. *Curr Biol*. 11(2),105-9.

297.) Zweegman S, Huijgens PC. (2002) Treatment of myeloma: recent developments. *Anticancer Drugs*. 13(4),339-51.

7. Anhang

Abkürzungen

9-1-1 Komplex	Rad9 / Rad1 / Hus1 Proteinkomplex
ABC	"ATP-binding cassette" APE
AP	Apurin-Stellen
APE	Apurin-Endonuklease
AT(M)	Ataxia telangiectasia (mutated)
ATLD	Ataxia telangiectasia-like Disorder
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	"Ataxia telangiectasia and Rad3 related"
BER	Basen-Exzisions-Reparatur
cDNA	copyDNA
Cisplatin	cis-Diamminodichloridoplatin
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
cRNA	copyRNA
CS	Cockayne-Syndrom
Cy	Cyanin
CYP	Cytochrom P
DME	"drug metabolizing enzyme"
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-abhängige Protein-Kinase
dRP	5'-Deoxyribose-5'-Phosphat
dRPa	DNA-Deoxyribophosphodiesterase
DSB	Doppelstrangbruch
DSBR	Doppelstrangbruch-Reparatur
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTIC	Dimethyl-trizeno-imidazol-Carboxamid
EtNU	Ethyl-Nitrosoharnstoff
FACS	"Fluorescence activated cell sorting" (Durchflusszytometrie)
FEN-1	"Flap Endonuclease 1"
G-/S-Phase	Gap-/Synthese-Phase
GG-NER	global genomische Nukleotid-Exzisions-Reparatur
GSH	SH-Gruppen tragendes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HNPCC	"hereditary nonpolyposis colorectal cancer"
HR	homologe Rekombination
MAK	monoklonaler Antikörper
MDR	"multi drug resistance"
MeNU	Methyl-Nitrosoharnstoff
MGMT	Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MMR	Mismatch-Reparatur
MPG	DNA-3-Methyladenin Glykosylase
Mre11	"Meiotic recombination 11 homolog"
MRN	Mre11-Rad50-Nbs1
mRNA	messengerRNA
MTH1	Mut T Homolog
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MX	Methoxyamin
MYH	Mut Y Homolog

Nbs	Nibrin
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
NHEJ	"non-homologous end-joining"
NL	Lymphozyten normaler Probanden
PARP	Poly (ADP-Ribose) Polymerase
PCNA	"Proliferating cell nuclear antigen"
Pol- β	DNA-Polymerase β
rel.	relativ
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
RPA	"replication protein A"
RT	Raumtemperatur
SCID	"severe combined immunodeficiency syndrome"
ssDNA	single strand DNA
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
TC-NER	Transkriptions-gekoppelte Nukleotid-Exzisions-Reparatur
UTP	Uraciltriphosphat
UV	Ultraviolett
XP	Xeroderma pigmentosa

Die Durchführung dieser Arbeit wurde durch eine Promotions- und Verbrauchsmittel-förderung des IFORES-Programms (Interne Forschungsförderung Essen) ermöglicht.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name : Meurer
Vorname : Bernd
geboren : 17.07.1978 in Düsseldorf

Schulbildung

08/1984 – 07/1988 Gemeinschaftsgrundschule Starkerseite, Kaarst
08/1988 – 06/1997 Albert-Einstein-Gymnasium, Kaarst
Abschluss: Abitur

Hochschulbildung

10/1997 – 09/1999 Vorklinischer Studienabschnitt
Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald
10/1999 – 09/2000 Erster klinischer Studienabschnitt
Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald
10/2000 – 04/2003 Zweiter klinischer Studienabschnitt
Universität GH Essen
04/2003 – 03/2004 Praktisches Jahr, Kath. Kliniken Essen-Nord
Schwerpunkt : Anästhesie / Intensivmedizin

Beruf

06/2004 Teilapprobation zum AiP
08/2004 – 09/2004 AiP in der Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin,
Universitätsklinikum Essen
10/2004 Approbation zum Arzt
seit 10/2004 Ass.-Arzt in der Klinik für Anästhesie und
Intensivmedizin, Universitätsklinikum Essen